



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA

NÚCLEO DE SAÚDE

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE NANOCORPOS ATIVOS
CONTRA CROTOXINA: UMA NEUROTOXINA DA SERPENTE**

Crotalus durissus terrificus

MARCOS BARROS LUIZ

PORTO VELHO – RO

2014

MARCOS BARROS LUIZ

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE NANOCORPOS ATIVOS
CONTRA CROTOXINA: UMA NEUROTOXINA DA SERPENTE**

Crotalus durissus terrificus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental PGBIOEXP da Universidade Federal de Rondônia – UNIR, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Carla Freire Celedônio
Fernandes

PORTO VELHO – RO

2014

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE NANOCORPOS ATIVOS
CONTRA CROTOXINA: UMA NEUROTOXINA DA SERPENTE
Crotalus durissus terrificus

MESTRANDO: MARCOS BARROS LUIZ

Comissão Examinadora

Dr. Carla Freire Celedonio Fernandes

Dra. Stella Zamuner

Dr. Daniel Carvalho Pimenta

Examinadores Suplentes

Dr. Quintino Moura Dias Junior

Dr. Roberto Nicolete

Data da defesa de dissertação: 29/04/2014.

Resultado: APROVADO

"Não sei como o mundo me vê, mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali, uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita, mas tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, O grande oceano de verdades".
(Isaac Newton).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grande criador do universo, autor e consumidor de todas as coisas, **Deus**.
“Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente”
(Romanos 11:36).

Aos meus pais pela dedicação no ensino da verdade e da justiça, base para vivência em sociedade.

Ao Amigo, mestre e companheiro de todas as horas, Jaiel de Assis.

À minha esposa Tatiane Patricio pelo esforço dedicado em todos os momentos.

À Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes, pela orientação prestada, sinceridade, paciência, incentivo e caráter.

À Dra. Soraya Pereira dos Santos, pela excelente capacidade de liderança, ensinamentos e amizade.

Ao Dr. Andreimar Martins Soares, pela cooperação e disposição em nos auxiliar no que fosse necessário.

À Marta Gabriela pela dedicação e auxílio no projeto.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia de Anticorpos e Genética: Msc. Nidiane Dantas, Michele Suelen, Michele Pereira, Naan Rodrigues, Marcela Cristina, Msc. Andreisse Arruda e Rudson Horlanda, Lillian Cantanhede, Iasmin Ferreira.

Ao Dr. Anderson M. Kayano, Msc. Leandro Moreira e demais colaboradores do laboratório CEBio, pelo auxílio técnico e companherismo.

Ao Dr. Fernando Zanchi pela colaboração em bioinformática.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental - UNIR.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fiocruz – BA, pelo sequenciamento das amostras.

Aos Laboratórios da Fiocruz Rondônia e CEPEM pelo suporte para desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsas de estudos.

RESUMO

No Brasil cerca de 7,5 % dos casos de envenenamento ofídico são causados por serpentes do gênero *Crotalus*, os quais originam uma taxa de mortalidade de 1,8 %. Os efeitos neurotóxicos, miotóxicos e nefrotóxicos ocasionados pelo envenenamento crotálico estão principalmente relacionados à crotoxina (CTX), um heterodímero formado por interações não covalentes entre uma fosfolipase A₂ básica (CB) enzimaticamente ativa, e a crotapotina (CA), componente ácido e enzimaticamente inativo. O tratamento é realizado por meio da administração de imunobiológicos derivados de cavalos hiperimunizados. Além do alto custo de produção, os soroterápicos são pouco eficazes na neutralização de toxinas em tecidos profundos e podem causar reações adversas. Assim é crescente a busca por métodos complementares para os casos de envenenamento ofídico. Camelídeos produzem anticorpos funcionais desprovidos de cadeia leve, onde a região de reconhecimento antigênico é formada por domínio único denominado VHH ou nanocorpo. Além de estável a variações de temperatura e pH, importante para tratamento em campo, nanocorpos possuem um décimo do peso dos anticorpos convencionais, baixa imunogenicidade, são capazes de neutralizar toxinas animais e podem ser produzidos em microrganismos. Explorando essas vantagens, este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar VHH de *Lama glama* que reconheçam a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*. Para isso, a tecnologia *phage display* foi empregada. Após o monitoramento da resposta imune de um *Lama glama* previamente imunizado com CA, CB e CTX por ELISA, fragmentos VHHs foram amplificados por RT-PCR usando cDNA sintetizado após a extração de RNA de linfócitos periféricos do animal. O repertório gênico de VHH foi inserido no vetor fagomídeo pHEN1 e uma biblioteca primária, com título de $3,6 \times 10^{12}$ ufc, foi construída utilizando a cepa *E. coli* TG1. Após a infecção da biblioteca com o fago auxiliar VCSM13, VHHs, expressos fusionados a proteína III da superfície do bacteriófago, foram selecionados utilizando imunotubos adsorvidos com CTX, CA e CB. Dois clones reconheceram CA, enquanto 76 e 58 reconheceram CB e CTX em ELISA, respectivamente. Após o sequenciamento, cinco perfis clonais foram identificados, analisados *in silico* e depositados no *GenBank*. O clone KF498604 foi subclonado em vetor pHEN1-6HIS, transformado em cepa *E. coli* HB2151 e purificado por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto. A especificidade deste clone à subunidade CB e a reatividade cruzada com veneno de subespécies de *Crotalus durissus* foi verificada por ELISA. De acordo com os resultados obtidos, os nanocorpos selecionados podem ser ferramentas interessantes para auxiliar no tratamento do envenenamento crotálico, entretanto a capacidade de neutralização dos clones precisa ser investigada.

Palavras-Chave: VHH, nanocorpos, crotoxina, *Crotalus durissus terrificus*, *phage display*.

ABSTRACT

In Brazil about 7.5 % cases of snakebite envenoming are caused by snakes of the genus *Crotalus*, which originate a mortality rate of 1.87 %. Neurotoxic, nephrotoxic and myotoxic effects of crotalus envenoming are mainly related to the crotoxin (CTX), a heterodimer formed via noncovalent interactions between the phospholipase A2 (CB) basic and enzymatically active, and crotapotin (CA), acid component and enzymatically inactive. Treatment has been carried out by administering immunobiologics derived from hyperimmunized horses. Besides high cost of production, the serumtherapy is less effective in neutralizing toxins into deep tissues and can cause adverse reactions. Thus, the search for complementary methods in cases of snakebite envenoming has been increasing. Camelids produce antibodies devoid of light chains, in which the antigen recognition region is formed by the single domain called VHH or nanobody. In addition to thermal and pH stability, important for field treatment, nanobodies are one-tenth the size of conventional antibodies, possess low immunogenicity, are able to neutralize animal toxins and can be produced in microorganisms. Exploring these advantages, this work aimed to select and characterize VHH fragments of *Lama glama* that recognize the crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*. For this, the phage display technology was employed. After monitoring the immune response of a *Lama glama* previously immunized with CA and CB and CTX by ELISA, VHHs fragments were amplified by RT-PCR using cDNA synthetized after RNA extraction from peripheral lymphocytes of the animal. VHH gene repertoire was inserted into the phagemid pHEN1 and a library, with a titer of 3.6×10^{12} ufc, was constructed using *E.coli* TG1 strain. After infection of the primary library with helper phage VCSM13, VHHs, expressed on the surface of the bacteriophage fused to protein III, were selected using immunotubes adsorbed with CTX, CA and CB. Two clones recognized CA, while 76 and 58 recognized CB and CTX in ELISA, respectively. After sequencing, five profiles were identified, analyzed *in silico* and deposited into *GenBank*. The KF498604 clone was recombined into vector pHEN1-6HIS, transformed into *E. coli* HB2151 strain and purified by affinity chromatography in cobalt column. The specificity of this clone to the CB subunit and cross-reactivity with venom of *Crotalus durissus* subspecies was verified in ELISA. According to the preliminary results, the selected nanobodies seems to be interesting tools to help the treatment of crotalus envenoming, however, the neutralizing capacity of the clones need to be evaluated.

Keywords: VHH, nanobodies, crotoxin, *Crotalus durissus terrificus*, phage display.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos de envenenamento ofídico no Brasil entre 2000 e 2012.....	14
Figura 2: Espécime <i>Crotalus durissus</i> e distribuição geográfica.....	15
Figura 3: Fenômenos clínicos do envenenamento crotálico.....	16
Figura 4: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos do gene Pró-CA, CA ₂ , CBb, CB _{A2}	19
Figura 5: Estrutura cristalográfica do complexo heterodimérico crotoxina (isoforma CA ₂ CBb)	20
Figura 6: Digestão enzimática de IgG por pepsina ou papaína.....	24
Figura 7: Domínios VHH de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos.....	29
Figura 8: Estratégia metodológica empregada na seleção e caracterização de VHH ativos contra crotoxina, subunidades CA e CB de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	32
Figura 9: Estratégia de clonagem e isolamento do fragmento VHH por RT-PCR.....	38
Figura 10: Organização estrutural do fagomídeo pHEN1.....	40
Figura 11: Monitoramento da resposta imunológica do camelídeo após administração de crotoxina, CB e CA.....	48
Figura 12: Amplificação do repertório gênico de VHH.....	49
Figura 13: Análise qualitativa da biblioteca primária por PCR de colônia.....	50
Figura 14: Ensaio imunoenzimático dos clones pós- <i>panning</i> contra crotoxina (A) e CB (B).....	51
Figura 15: Alinhamento múltiplo entre os clones selecionados contra crotoxina, CB e CA.....	52
Figura 16: Amplificação do VHH-pHEN1-6HIS após transformação em <i>E. coli</i> HB2151.....	53
Figura 17: Análise eletroforética do clone KF498604 expresso em <i>E. coli</i> HB2151 e purificado em coluna de afinidade a cobalto.....	54
Figura 18: Avaliação da imunoreatividade do clone KF498604 com diferentes venenos e toxinas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP - Ampicilina

AST - Aspartase aminotransferase

BoNT/E - Neurotoxina butolínica E

CA - Crotoxina A, Crotapotina

CB - Crotoxina B, PLA₂cro

CDR - Região determinante de complementariedade

CH - Domínio constante da cadeia pesada de anticorpo

CK - Creatinocinase

CL - Domínio constante da cadeia leve de anticorpo

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DEPC - Dietilpirocarbonato

DHL - Desidrogenase láctica

dsFv - Fragmento variável ligado por pontes dissulfeto

DTT – Dithiothreitol

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática

F(ab')₂ - Fragmentos de ligação a antígeno ligados por pontes dissulfeto

Fab - Fragmento de ligação a antígeno

Fc - Fragmento cristalizável

GLU - Glicose

HCAbs - Anticorpos de cadeia pesada

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulinas G

IGHG - Genes de imunoglobulinas G constantes

INF- γ - Interferon gama

IPTG - Isopropil- β -D-thiogalactopiranosideo

IRA - Insuficiência renal aguda

KANA - Kanamicina

K_d - Constante de dissociação

Nb – do inglês: *Nanobody*

PBS - Tampão fosfato-salino

PBST - Tampão fosfato-salino - tween 20

PEG - Polietilenoglicol

PGE₂ – Prostaglandina E2

pHEN1 - Vetor fagomídeo

pHEN1-6HIS – Fagomídeo pHEN1 carreando 6 resíduos de histidina

PLA₂ - Fosfolipase A₂

RT-PCR - Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SAB - Soro antibotrópico

SABL - Soro antibotrópico-laquétrico

SAC - Soro anticrotático

SAE - Soro antielapídico

SAL - Soro antilaquétrico

scFv - Fragmento variável de cadeia única

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SPR - Ressonância Plasmônica de Superfície

TEMED - N,N,N',N'-tetra metiletilenodiamina

TMB - Tetrametilbenzidina

VCSM13 - Fago filamentoso

VH - Domínio variável da cadeia pesada de anticorpos

VHH - Domínio variável da cadeia pesada de anticorpos de cadeia pesada

VL - Domínio variável da cadeia leve de anticorpo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS ACIDENTES OFÍDICOS.....	13
1.2 O GÊNERO <i>Crotalus</i> NO BRASIL.....	14
1.3 ENVENENAMENTO CROTÁLICO.....	15
1.4 COMPOSIÇÃO PROTEICA DO VENENO DE <i>Crotalus durissus terrificus</i>	16
1.5 CROTOXINA: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E TOXICOLÓGICAS.....	18
1.6 SOROTERAPIA ANTIOFÍDICA.....	22
1.7 OS DESAFIOS DA SOROTERAPIA ANTIOFÍDICA.....	26
1.8 ANTICORPOS DE CAMELÍDEOS.....	28
1.9 NANOCORPOS DERIVADOS DE HCABS.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 ANIMAL EXPERIMENTAL.....	33
3.2 REAGENTES.....	33
3.3 IMUNIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DO ANIMAL POR ELISA.....	34
3.4 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA PRIMÁRIA DE VHH.....	35
3.4.1 Extração de linfócitos.....	35
3.4.2 Extração de RNA.....	36
3.4.3 Síntese de cDNA.....	36
3.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase: Amplificação do repertório gênico de VHH.....	37
3.4.5 Obtenção de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetentes, cepas TG1 e HB2151.....	38
3.4.6 Digestão e recombinação do repertório gênico de VHH em vetor pHEN1.....	39
3.4.7 Transformação em <i>E.coli</i> TG1 e titulação da biblioteca.....	40
3.5 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA SECUNDÁRIA DE VHH.....	41

3.6 SELEÇÃO DE FAGOS RECOMBINANTES CONTENDO VHH FUSIONADO A GLICOPROTEÍNA III.....	42
3.7 CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES: PCR, ELISA E SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	43
3.8 SUBCLONAGEM DOS CLONES SELECIONADOS EM VETOR pHEN1-6HIS E TRANSFORMAÇÃO EM <i>E.coli</i> HB2151.....	44
3.9 EXPRESSÃO DO VHH E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE COBALTO.....	45
3.10 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE VHH EM POLIACRILAMIDA 12,5 %.....	46
3.11 TESTE DE IMUNORREATIVIDADE CRUZADA.....	47
4. RESULTADOS.....	47
4.1 MONITORAMENTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE CROTOXINA, CA E CB.....	48
4.2 BIBLIOTECA PRIMÁRIA DE VHH.....	49
4.3 SELEÇÃO DE CLONES ATIVOS: <i>PANNING</i> , ELISA E SEQUENCIAMENTO.....	50
4.4 EXPRESSÃO DE NANOCORPOS: SUBCLONAGEM EM pHEN1-6HIS, TRANSFORMAÇÃO EM <i>E.COLI</i> HB2151 E PURIFICAÇÃO.....	53
4.5 AVALIAÇÃO DE IMUNORREATIVIDADE CRUZADA.....	54
5. DISCUSSÃO.....	55
6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS ACIDENTES OFÍDICOS

O envenenamento ofídico é um importante problema de saúde pública especialmente em países da área tropical e subtropical da África, Ásia, Oceania e América Latina. Estima-se que no mundo ocorram anualmente 421 mil casos de acidentes ofídicos com cerca de 20.000 mortes (KASTURIRATNE et al., 2008). Com aproximadamente 81.000 casos por ano, a Índia é o país que apresenta maior índice de acidentes, estando associado a fatores econômicos, culturais, políticos e geográficos das vítimas, dificuldade na produção e qualidade dos soroterápicos, além do aparente descaso das autoridades públicas (BHAUMIK, 2013; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003).

No Brasil, somente no ano de 2012 foram notificados 29.084 casos de envenenamento envolvendo serpentes. Desses, 128 vieram a óbito. As regiões Norte, Nordeste e Sudeste são responsáveis pelos maiores índices de acidentes com 9.051, 7.006 e 7.349, respectivamente (Figura 1) (BRASIL, 2013). O perfil epidemiológico das vítimas revela que em sua maioria são trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade entre 15-49 anos (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Dentre as 386 serpentes catalogadas no Brasil, são encontradas 60 espécies consideradas peçonhentas, agrupadas nas famílias Elapidae e Viperidae. Os gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* pertencem à primeira família, enquanto *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, pertencem a segunda (BERNARDE, 2009; BÉRNILS; COSTA, 2012; MELGAREJO, 2003).

Os gêneros de serpentes peçonhentas de maior importância médica no Brasil são o *Bothrops*, responsável por 73,5 % dos casos notificados de acidentes, seguidos de *Crotalus* (7,5 %), *Lachesis* (3,0 %) e *Micrurus* (0,7 %). Sequelas e complicações clínicas locais são mais frequentes em acidentes botrópicos (10 % dos casos). Entretanto, são os acidentes crotálicos que apresentam maior índice de letalidade (1,87 %), chegando a 4,7 % quando o intervalo entre o acidente e o atendimento à vítima ultrapassa seis horas (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; BRASIL, 2009). O quadro clínico desses pacientes é característico. Enquanto as vítimas do gênero *Bothrops* podem apresentar comprometimento tecidual local,

devido ação direta de fosfolipases e metaloproteinases sobre a musculatura esquelética (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; RUCAVADO; GUTIÉRREZ, 2000), os pacientes com intoxicação crotálica apresentam fenômenos locais mínimos (edema e analgesia), característica paralisia muscular facial e, em alguns casos, mioglobínúria (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003).

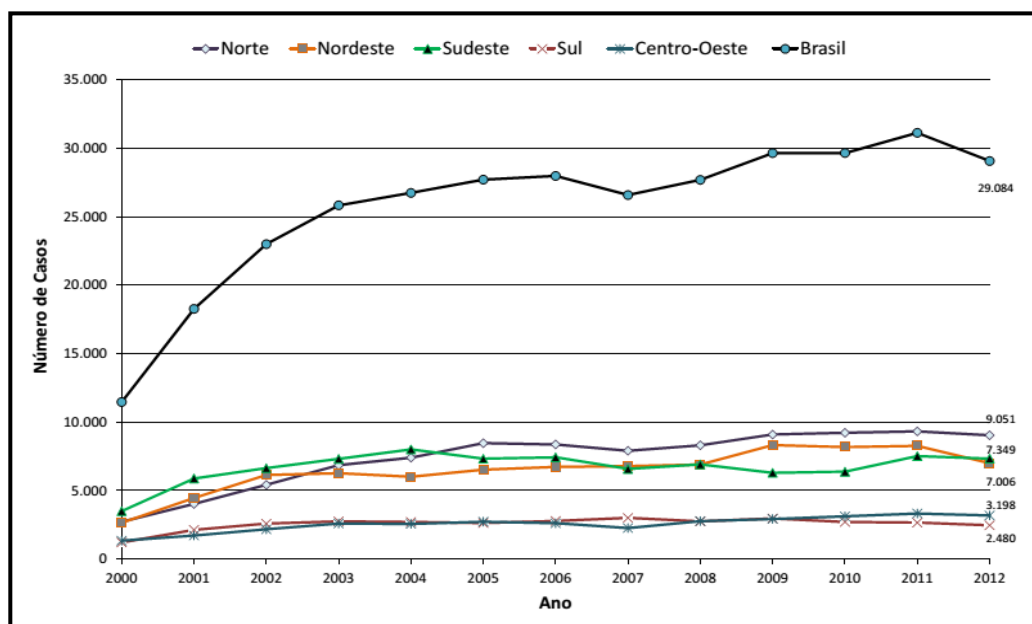


Figura 1: Casos de envenenamento ofídico no Brasil entre 2000 e 2012. Os acidentes foram agrupados nas cinco regiões da federação de acordo com o local do evento (em cores). Em preto está representado o número total de casos/ano no Brasil. Observa-se que a Região Norte lidera o número de casos, seguida pela região Nordeste e Sudeste (adaptado BRASIL, 2013).

1.2 O GÊNERO *Crotalus* NO BRASIL

Conhecida popularmente como Cascavel, Boicininga ou Maracambóia, a espécie *Crotalus durissus* é a única representante do gênero *Crotalus* no Brasil. São serpentes terrestres, robustas, pouco ágeis e facilmente identificáveis devido à presença de guizo na região caudal (Figura 2). Presentes em todas as regiões do país, habitam campos abertos, terrenos áridos e semi-áridos, além de cerrados. Quanto a classificação estas serpentes são agrupadas em seis subespécies geograficamente distintas: *Crotalus durissus dryinas* encontrada no estado de Amapá; *Crotalus durissus cascavella* identificada em regiões da caatinga no estado do Maranhão, Ceará, Piauí, Pernambuco, Alagoas, Rio grande do Norte e

Bahia; *Crotalus durissus collilineatus* presente nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal; *Crotalus durissus marajoensis* na Ilha do Marajó; *Crotalus durissus ruruima* em Roraima e *Crotalus durissus terrificus* nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e também em campos abertos do Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Pará (BÉRNILS; COSTA, 2012; GUIDOLIN et al., 2013; MELGAREJO, 2003).

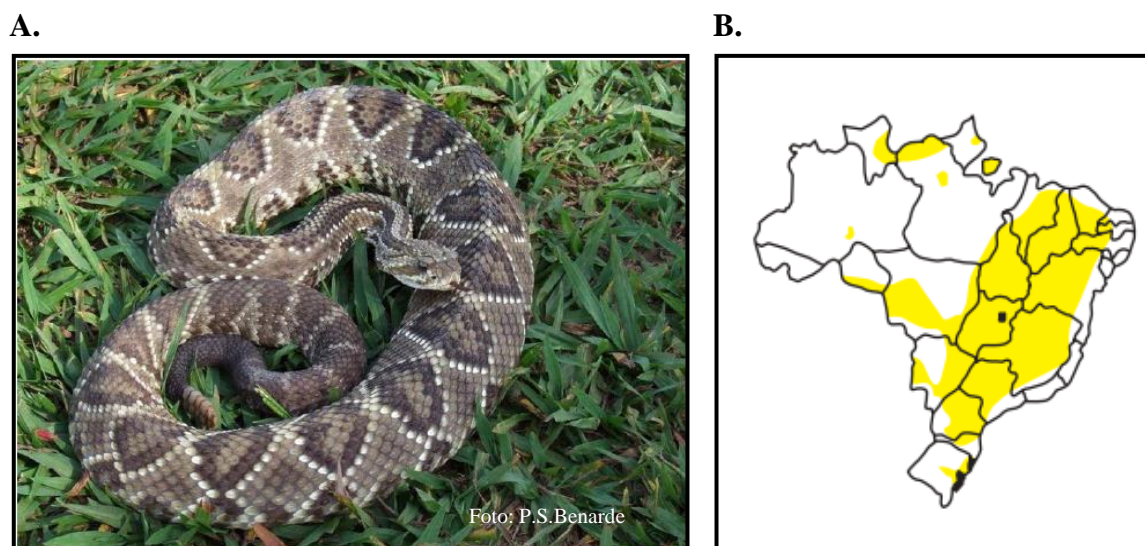


Figura 2: Espécime *Crotalus durissus* e distribuição geográfica. Devido à presença de guizo na região terminal da cauda, serpentes dessa espécie são de fácil identificação e recebem nome popular de Cascavel, Boicininga ou Maracambóia (A.). Encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas, essas serpentes apresentam ampla distribuição geográfica no Brasil (B.) (Fonte: BERNARDE, 2009; BRASIL, 2001).

1.3 ENVENENAMENTO CROTÁLICO

As manifestações locais são pouco evidenciáveis no envenenamento crotálico. Os pacientes podem apresentar parestesia local, edema e eritema discreto, sem queixa de dor intensa. Classicamente a *fácies miastênica*, caracterizada pela aptose papilar e flacidez da musculatura facial é a principal característica para o diagnóstico clínico. Este sintoma pode estar acompanhado de mialgia intensa, revelando lesão de fibras musculares esqueléticas, confirmada pela coloração avermelhada e progressivamente marron da urina do paciente, devido à presença de mioglobina (Figura 3) (Rabdomiólise com mioglobinúria) (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003). O aumento no tempo de coagulação e queixas de turvação visual também podem ser evidenciados. A dosagem de creatinocinase (CK), desidrogenase láctica (DHL), aspartase aminotransferase (AST) e aldolase, como também

ensaios de imunodifusão com anticorpos anti-mioglobina humana podem ser utilizados para o monitoramento da lesão muscular esquelética (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003). A demora ou tratamento inadequado pode levar o paciente a um quadro de Insuficiência Renal Aguda (IRA) por necrose tubular aguda, a causa de morte mais frequente entre as vítimas (AMARAL et al., 1986; JORGE; RIBEIRO, 1992). Em alguns casos a lesão renal pode ocorrer sem apresentação do quadro de mioglobinúria. Assim, é recomendado a dosagem de uréia e creatinina. A insuficiência respiratória pode ocorrer em pacientes graves e é atribuída ao efeito neurotóxico do veneno (AMARAL et al., 1986).

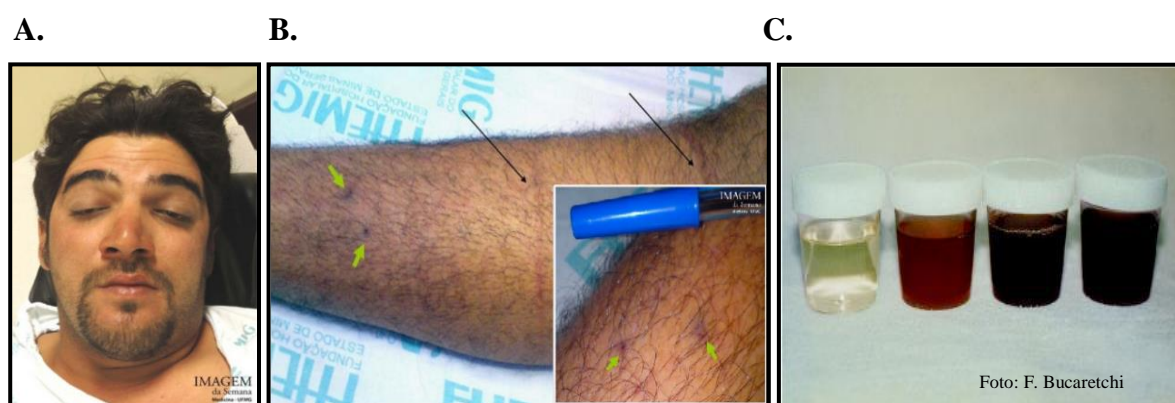


Figura 3: Fenômenos clínicos do envenenamento crotálico. A. Foto de paciente evidenciando aptose palpebral devido efeito neurotóxico do veneno; B. Local de inoculação do veneno apresentando rubor discreto; C. Escurecimento progressivo da urina devido mioglobinúria evidenciada em coleta sequencial 48 horas após o acidente (Adaptado de DIAS et al., 2013; BRASIL, 2001).

1.4 COMPOSIÇÃO PROTEICA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

Os compostos proteicos são responsáveis por produzir os efeitos neurotóxicos, miotóxicos, nefrotóxicos e distúrbios de coagulação no envenenamento crotálico (AZEVEDO-MARQUES et. al., 2003). Aproximadamente 90 % do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* é composto por proteínas com massa molecular entre 10-100 kDa, classificadas como Fosfolipases A₂ (48,5 %), Serinoproteases (25,3 %), 5'-nucleotidases (7,8 %), Metaloproteases (3,9 %), Fator de Crescimento Neural (1,9 %), Fosfodiesterases (1,9 %), Glutaminil ciclases (1 %), além de sequências não identificadas (9,7 %) (GEORGIEVA et al., 2009). As principais toxinas presente no veneno são a crotoxina, giroxina, convulxina e crotamina (MARTINS et al., 2002).

A crotoxina (24 kDa) é um heterodímero formado por uma subunidade básica fosfolipásica enzimaticamente ativa, (CB, crotoxina B, PLA₂cro) e uma subunidade ácida sem atividade enzimática ou tóxica, (CA, crotoxina A, crotapotina) (FAURE; XU; SAUL, 2011; SAMPAIO et al., 2010). Esta toxina constitui a fração proteica mais abundante no veneno de *Crotalus durissus terrificus* (cerca de 50 %), sendo responsável principalmente pelos efeitos neurotóxicos, miotóxicos sistêmicos e nefrotóxicos do envenenamento (MARTINS et al., 2002; SAMPAIO et al., 2010).

A segunda família de toxinas mais presentes no veneno são as serinoproteases. Entre estas a gioxina (28-34 kDa) é a proteína mais abundante (cerca de 9,6 %) e estudada. Essa toxina quando administrada em camundongos apresenta evento neurológico transitório perceptível, no qual o animal apresenta rotação no próprio eixo. Por ser uma enzima do tipo *trombina-símile* com atividade sobre o fibrinogênio, pode estar relacionada a distúrbios de coagulação sanguínea observados no envenenamento (ALEXANDER et al., 1988; GEORGIEVA et al., 2009; PASSERO et al., 2007).

A convulxina, com 68 kDa, representa cerca de 5 % do veneno bruto e é capaz de promover convulsões com intervalos de curta duração, distúrbios visuais e respiratórios em modelos animais experimentais. Por ser uma proteína *C-lectina símile* apresenta ainda capacidade de agregação plaquetária podendo causar distúrbios de coagulação (POLGÁR et al., 1997; PRADO-FRANCESCHI; BRAZIL, 1981).

Outro importante componente presente no veneno é a crotamina (4,8 kDa). Representando cerca de 21,7 % do veneno de *C. durissus terrificus*, esse peptídeo catiônico não possui atividade enzimática e desencadeia atividade miotóxica possivelmente pela capacidade de reduzir o potencial de repouso da membrana celular, promover o influxo de íons Na⁺ e impedir a liberação de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático e/ou também a capacidade de ligação a canais de K⁺ (KERKIS et al., 2010; OWNBY, 1998; PASSERO et al., 2007).

1.5 CROTOXINA: CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E TOXICOLÓGICAS

Em 1938, Slotta e Fraenkel-Conrat, pesquisadores alemães contratados pelo Instituto Butantan, purificaram e cristalizaram um componente proteico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* com atividade neurotóxica, a crotoxina (SAMPAIO et al., 2010; SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938). Somente em 1958 foi possível verificar que a toxina isolada se tratava de um dímero formado por monômeros heterogêneos (FRAENKEL-CONRAT; SINGER, 1956). Em 1971, os monômeros foram purificados por cromatografia e denominados de CA, crotoxina A ou crotapotina, a subunidade ácida e CB, crotoxina B ou PLA₂cro, a subunidade básica (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971).

São conhecidas quatro isoformas da subunidade ácida CA (CA₁, CA₂, CA₃, CA₄) derivadas de mudanças pós-traducionais de um único precursor gênico (pró-CA), semelhante aos das famílias de fosfolipases A₂ (BOUCHIER et al., 1991; FAURE et al., 1994). A diferença entre as isoformas é resultado da variação do tamanho das cadeias alfa e beta, possivelmente por ação de endopeptidases e exopeptidases, e também ciclização do resíduo NH₂-α do aminoácido glutamina presente na posição 77 e 120 N-terminal dessas cadeias, respectivamente (FAURE et al., 1991). A análise cristalográfica da isoforma CA₂ demonstra que a diferença entre sua sequência e o gene Pró-CA é de 34 aminoácidos, compreendendo os resíduos entre as posições 1-22, 70-76 e 113-118 (Figura 4). Esta subunidade possui apenas 9 kDa, e é formada por cadeias α (39 resíduos de aminoácidos), β (35 resíduos) e γ (14 resíduos) ligadas entre si por sete pontes dissulfeto (Figura 5A). De modo semelhante às enzimas PLA₂ possuem aminoácidos importantes para a ligação com o íon Ca²⁺ (Tyr28, Gly30 e Gly32) e atividade catalítica (Asp49), porém a ausência do “loop” de ligação a este íon justifica a falta de atividade fosfolipásica e os resíduos Tyr28 e Gly30 estão envolvidos na interface de interação com CB (FAURE; XU; SAUL, 2011). Mesmo não apresentando atividade tóxica direta, CA tem um importante papel na atividade neurotóxica de crotoxina por bloquear estericamente o sítio catalítico de CB, impedindo acesso de substrato, reduzindo a atividade catalítica do complexo e direcionando-o ao sítio de ligação nas junções neuromusculares (FAURE; XU; SAUL, 2011; HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971).

A subunidade CB é uma fosfolipase classificada no grupo A₂ (PLA₂). Neste grupo são classificadas fosfolipases que não apresentam cisteína nas posições 51 e 133 e possuem região C-terminal maior, com cinco a sete aminoácidos extras (STÁBELI et al., 2012). Devido à presença do aminoácido aspartato na posição 49, CB pode ser ainda classificada no

grupo das fosfolipases miotóxicas Asp49 (OWNBY et al., 1998). Essas enzimas hidrolisam a ligação éster *sn*-2 de glicerofosfolipídios (STÁBELI et al., 2012). A atividade fosfolipásica de CB está diretamente relacionada aos efeitos neurotóxicos, miotóxicos e nefrotóxicos observados no envenenamento crotálico. A partir do veneno de *C. durissus terrificus* foram isoladas quatro isoformas de CB (CBa₂, CBb, CBc e CBd), geradas por distintos RNA's mensageiros. A estrutura protéica de CBa₂, CBb e CBc foram resolvidas por cristalografia, enquanto os genes que codificam as duas primeiras foram sequenciados (BOUCHIER et al., 1991; FAURE; XU; SAUL, 2011; MARCHI-SALVADOR et al., 2008). O alinhamento protéico das isoformas identificadas demonstra que as diferenças de aminoácidos ocorrem nas posições 1, 19, 34, 74, 92, 115, 116 e 128 (Figura 4). A cristalografia de CBb revela estrutura com 122 aminoácidos, composta por quatro cadeias alfa hélices (A, B, C, D), estrutura β -wing entre C e D e um "loop" de Ca²⁺ (Figura 5B). A estrutura tridimensional é estabilizada por sete pontes dissulfeto entre suas cadeias (FAURE; XU; SAUL, 2011).

	1	10	20	30	40	50	60	70
ProCA	SLVEFETLMMKIAG-RSGISYSSYG	CGCYCGAGGQGW	QDASDRCCFEHDCCYAKLT	--G-C----	DPTT			
CA2			SSYG	CGCYCGAGGQGW	QDASDRCCFEHDCCYAKLT	--G-C----	DPT	
CBb	HLLQFNKMIKFETR-KNAV	PFYAFYGCYCGWGG	GRPKDATDRCCFVHDCCYGKLA	--K-C----	NTKW			
CBa ₂	SLLQFNKMIKFETR-KNAV	PFYAFYGCYCGWGG	GRPKDATDRCCFVHDCCYGKLA	--K-C----	NTKW			
CBc	HLLQFNKMIKFETR-KNAV	PFYAFYGCYCGWGG	GRPKDATDRCCFVHDCCYGKLA	--K-C----	NTKW			
	71	80	90	100	110	120	130	133
ProCA	DVYTYRQEDGEIVCGE-DDPCGTQICECDKAAAI	CFRNSMDTYDYKYLQFSP-ENCQGESQPC						
CA2		EE	DGEIVCGE-DDPCGTQICECDKAAAI	CFRNSMDT	EFSP	ENCQGESQPC		
CBb	DIYRYSLKSGYITCGK-GTWCE	EQICECDRVAAECLRRSLSTYKNGYMFYPD-SRCRGPSETC						
CBa ₂	DIYRYSLKSGYITCGK-GTWCE	EQICECDRVAAECLRRSLSTYKNEYMFYPD-SRCRGPSETC						
CBc	DIYRYSLKSGYITCGK-GTWCE	EQICECDRVAAECLRRSLSTYKNGYMFYPD-SRCRGPSETC						

Figura 4: Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos dos genes Pró-CA, CA₂, CBb, CBa₂. A isoforma CA₂ apresenta deleção pós-transcricional de aminoácidos nas regiões 1-22, 70-76 e 113-118, em relação ao precursor Pró-CA. Os aminoácidos na região N-terminal das cadeias α e β de CA₂ apresentam ciclização de glutamina para ácido pirrolidona carboxílico (letra E em negrito). Os resíduos que diferem as isoformas de CB estão marcados em azul. A mudança do aminoácido histidina na posição 01 (um) de CBb (Classe I), por serina em CBa₂ (Classe II) pode contribuir para a menor estabilidade das isoformas de crotoxina formadas por CBa₂ e CA (Adaptado de FAURE; XU; SAUL, 2011).

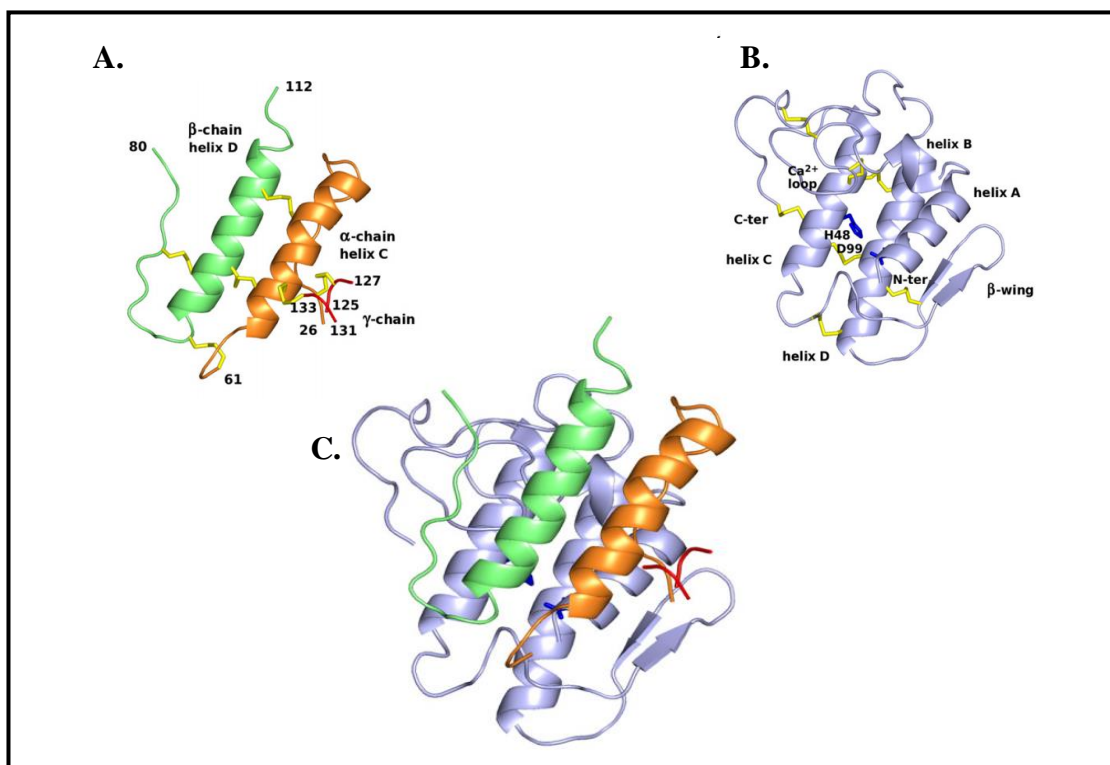


Figura 5: Estrutura cristalográfica do complexo heterodimérico crotoxina (isoforma CA₂CBb). Estruturas em diagramas de *Ribbon* demonstrando as subunidades CA₂, CBb e crotoxina. As cadeias α, β e γ de CA₂ são demonstradas em laranja, verde e vermelho, respectivamente (A). As hélices α e β são homólogas as C e D de CBb. As hélices A, B, C e D, como também as estruturas β-wing e loop de ligação ao Ca²⁺ são evidenciadas em CBb (B). Nas duas subunidades observa-se a presença de sete pontes dissulfeto (amarelo) entre as cadeias, estabilizado o arranjo tridimensional. Observa-se que CA₂ bloqueia estericamente o sítio catalítico de CBb impedido acesso de substrato à dríade catalítica His48 e Asp99 (azul) no heterodímero crotoxina (C) (Adaptado de FAURE; XU; SAUL, 2011).

A crotoxina semelhante a outras β-neurotoxinas, atua principalmente em neurônio pré-sináptico, causando bloqueio neuromuscular com consequente paralisia motora e dano celular (BRAZIL; EXCELL, 1971; HAWGOOD; SMITH, 1977; KRIZÁJ; GUBENSEK, 2000). Com mecanismo de ação trifásico, ao interagir com neurônio pré-sináptico, provoca redução dos níveis de acetilcolina, seguido de aumento transiente, e no terceiro estágio, diminuição dos níveis de liberação do neurotransmissor, podendo causar bloqueio completo (CHANG; LEE, 1977, RODRIGUES-SIMIONI; HAWGOOD; SMITH, 1990; SAMPAIO et al., 2010). A atividade fosfolipásica da subunidade CB não é suficiente para o desenvolvimento de efeitos neurotóxicos e, além disso, a especificidade de local de ação sugere a interação com aceptores específicos em neurônio pré-sináptico (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; KRIZÁJ; GUBENSEK, 2000). Um aceptor de crotoxina com 48 kDa foi purificado de órgão elétrico de *Torpedo marmorata* (CAPT, proteína aceptora de

crotoxina em *Torpedo*) e após análise da cinética interação por Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) foi possível observar a formação de um complexo ternário formado por CA-CB-CAPT, demonstrando assim a interação crotoxina-aceptor e também a importância da subunidade CA na formação desse complexo (FAURE et al., 2003).

No veneno de *C. durrisus terrificus* podem ser encontradas 16 isoformas de crotoxina formadas pela ligação não covalente entre CA (CA₁, CA₂, CA₃, CA₄) e CB (CBA₂, CBb, CBc e CBD) (FAURE; BON, 1987; FAURE; XU; SAUL, 2011). De acordo com a estrutura de CB presente no dímero, as isoformas de crotoxina podem ser agrupadas em classe I e II, com atividades biológicas distintas. A classe I, a qual apresenta elevada toxicidade com baixa atividade enzimática, é formada por CBb, CBc ou CBD complexada com qualquer isoforma de CA. A classe II, por sua vez, é gerada por CBA complexada a uma das isoformas de CA e, ao contrário da primeira classe, apresenta baixa toxicidade e elevada atividade enzimática. Essas diferenças estão relacionadas à constante de dissociação (K_d) do complexo heterodimérico, onde na primeira classe é menor ($K_d = 4.5$ nM) dissociando-se mais lentamente (aproximadamente 20 minutos), possibilitando um tempo maior para o acesso às junções neuromusculares. Na classe II, o K_d maior que 25 nM demonstra uma menor estabilidade com dissociação rápida (aproximadamente 1 minuto), o que causa a liberação de CB do complexo elevando a atividade enzimática (FAURE et al., 1993). A análise cristalográfica da isoforma CBb (Classe I) e CBA₂ (classe II) revela que a mudança do aminoácido histidina por serina na posição 01 (um) de CBA₂ em relação à CBb (Figura 4) e o deslocamento angular do triptofano na posição 70, impede sua interação com aminoácido aspartato 89 da subunidade CA₂ diminuindo a interação CA-CB nas isoformas crotoxina de classe II, o que pode justificar a rápida dissociação, maior acesso de substrato e elevada atividade enzimática (FAURE; XU; SAUL, 2011).

Além de interferir a nível pré-sináptico, a crotoxina parece causar bloqueio na sinapse colinérgica por atuar diretamente na dessensibilização de receptores nicotínicos de neurônios e placa motora, por meio da subunidade CB (BON et al., 1979; BRAZIL; FONTANA; HELUANY, 2000).

A crotoxina causa danos à musculatura esquelética sistêmica por atividade miotóxica exercida pela ação fosfolipásica da subunidade CB sobre as membranas de miócitos (Sarcolema) causando influxo de Ca^{2+} . O aumento desse íon em mitocôndrias e retículo sarcoplasmático com posterior degeneração organelar é evidenciada por micrografia

eletrônica de células musculares de murinos após administração de doses subletais de crotoxina (GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984). O dano tecidual pode ser evidenciado ainda por cortes histológicos que apresentam injúria de, principalmente, fibras ricas em mioglobina, mitocôndrias e atividade oxidativa (fibras tipo I), e do tipo II-A, com moderada atividade oxidativa. Essa seletividade pode estar relacionada a maior vascularização desses tipos de fibras, o que possibilita melhor permeabilidade da toxina nesses tecidos (SALVANI et al., 2000).

A Insuficiência renal aguda é a mais frequente complicação clínica evidenciada no envenenamento crotálico e também a maior causa de óbitos (AMARAL et al., 1986; JORGE; RIBEIRO, 1992). A crotoxina é o principal componente do veneno capaz de causar nefrotoxicidade direta, podendo alterar parâmetros renais como resistência vascular, taxa de filtração glomerular, fluxo urinário, percentual de transporte de sódio, potássio e cloreto em modelo de perfusão renal em ratos (MARTINS et al., 2002). Essas alterações ocorrem possivelmente por ação direta nos glomérulos e túbulos renais ou ainda por liberação de mediadores inflamatórios locais (MARTINS et al., 1998). A mioglobínúria, causada pelo extenso dano à musculatura esquelética, também está associada à lesão renal direta podendo causar necrose tubular (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985).

1.6 SOROTERAPIA ANTIOFÍDICA

O primeiro registro de imunização utilizando toxinas animais data 1887 quando o Dr. Henry Sewall demonstrou que pombos tornavam-se imunes ao veneno de serpente *Sistrurus catenatus*, após tratamento prévio com doses crescentes do composto acrescido com glicerina (ESPINO-SOLIS et al., 2009; SEWALL, 1887). Em 1894, dois grupos de pesquisa, um liderado por Albert Calmette do Instituto Pasteur e outro por Césaire Auguste Phisalix e Gabriel Bertrand do Museu Nacional de História Natural (ambos localizados em Paris – França), observaram que soros de animais imunizados com veneno de serpente conferiam imunidade passiva a animais não imunizados. Historicamente é atribuído a Calmette maior mérito na descoberta, principalmente por ter desenvolvido protocolos eficientes de produção de soros e promover a divulgação da soroterapia como alternativa eficiente para o tratamento antiofídico (BOCHNER, 2003; ESPINO-SOLIS et al., 2009). A descoberta inspirou outros grupos de pesquisas, como o liderado por Vital Brazil, que em 1901 fundou o Instituto

Serumtherápico Butantan em São Paulo, tornando-se responsável pela pesquisa, produção e distribuição de soros contra venenos de serpentes brasileiras. Em um sistema de permuta, em contrapartida a produção e distribuição de soros, o laboratório recebia boletins epidemiológicos dos envenenamentos, como também serpentes capturadas em diferentes regiões, garantindo assim o fornecimento de veneno necessário para imunização dos animais e insumos para produção científica nas áreas de ofiologia, toxicologia e epidemiologia. Vital Brazil foi responsável por demonstrar que a especificidade dos soros estava relacionada ao gênero de serpentes do qual era extraído o veneno, contrariando Calmette que acreditava que as neurotoxinas de serpentes eram semelhantes, podendo então ser tratadas com soros não específicos (BOCHNER, 2003; BRAZIL, 2003).

Os soroterápicos convencionais são produzidos a partir de imunoglobulinas G (IgG) não humanas obtidas principalmente de cavalos e ovelhas hiperimunizados. Com estrutura altamente conservada entre as espécies de vertebrados, as IgGs são moléculas tetraméricas com cerca de 150 kDa, formada por ligações dissulfeto entre duas cadeias pesadas (H) de aproximadamente 55 kDa cada e duas cadeias leves (L) com aproximadamente 22 kDa cada. As cadeias H são formadas por 3 domínios constantes denominados CH1, CH2 e CH3 e um variável, VH, na posição amino-terminal, enquanto as cadeias L apresentam somente um domínio constante CL e um variável VL (Figura 6). As regiões variáveis da cadeia H e L possuem três regiões determinantes de complementaridade (CDR's) cada, formando a interface de interação com o antígeno, enquanto os domínios H carboxi-terminais são responsáveis por desempenhar funções efectoras. Entre os domínios CH1 e CH2 existe uma região rica em aminoácidos prolina que confere flexibilidade a molécula (Região de dobradiça), fazendo com que a interface de interação com antígenos possa assumir vários ângulos (KUBY et al., 2007).

Os animais são imunizados com doses subcutâneas semanais de veneno bruto ou *mix* de diferentes venenos objetivando produção de soros mono e poliespecíficos, respectivamente. A imunização pode ser acrescida de adjuvante de Freund, hidróxido de alumínio ou alginato objetivando a indução de resposta imune. Após verificação de título adequado de anticorpos neutralizantes, IgG's (150 kDa) são purificadas do plasma do animal por precipitação com sulfato de amônio, sulfato de sódio ou ácido caprílico. Fragmentos F(ab')₂ com cerca de 100 kDa podem ser gerados por digestão de plasma contendo IgG, utilizando enzima pepsina em pH ácido para a remoção da região Fc, enquanto fragmentos

Fab (50 kDa) são gerados após digestão com papaína (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003; VELARDE, 2000). Os fragmentos gerados por digestão enzimática (Figura 6) são purificados por precipitação, utilizando sulfato de amônio, sulfato de sódio ou ácido caprílico que posteriormente são removidos da solução por diálise, ultracentrifugação ou cromatografia de troca iônica. O purificado pode ser mantido à 60 °C por 10 horas para pasteurização e posteriormente envasado em forma líquida ou liofilizada (THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003). O controle de qualidade garante a esterilidade e a ausência de pirogênios nos lotes produzidos. Durante esta etapa são realizados testes *in vivo* para verificação da capacidade de neutralização do antiveneno e testes *in vitro* avaliam a capacidade de inibição de atividade hemolítica, fibrinolítica, proteolítica e fosfolipásica de componentes específicos do veneno. Imunoensaios como *Western blot*, ELISA e imunoprecipitação são utilizados para comparar a especificidade e afinidade de diferentes lotes e a imunorreatividade cruzada com venenos de diferentes serpentes (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998).

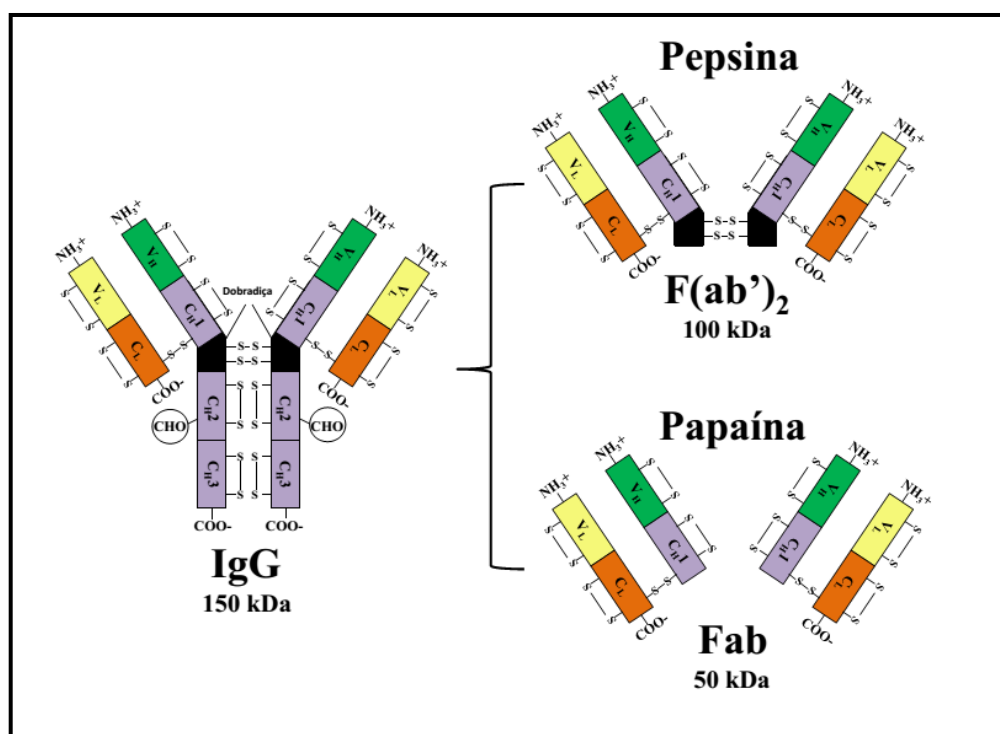


Figura 6: Digestão enzimática de IgG por pepsina ou papaína. Fragmentos F(ab')₂ com 100 kDa podem ser gerados por digestão utilizando enzima pepsina, enquanto a digestão com papaína geram dois fragmentos Fab com 50 kDa cada (Adaptado de KUBY et al., 2007).

Devido a diferença em massa molecular, os soroterápicos compostos por IgG, fragmentos F(ab')₂ ou Fab, possuem perfis farmacocinéticos variados. Os fragmentos Fab apresentam melhor biodistribuição atingindo facilmente compartimentos extracelulares, porém, são eliminados por filtração glomerular necessitando de consecutivas doses. As Imunoglobulinas G, diferentes dos fragmentos Fab, não sofrem filtração glomerular e são eliminadas lentamente por células do sistema imune, permanecendo mais tempo na circulação sanguínea, sendo dessa forma mais eficientes na neutralização sistêmica de toxinas. Por possuírem uma taxa de distribuição semelhante a do plasma, as IgG apresentam baixa taxa de biodistribuição o que as tornam pouco eficientes na neutralização de toxinas em tecidos. Os fragmentos F(ab')₂ possuem perfil farmacocinético intermediário, sendo eficientes na neutralização sistêmica de toxinas, além de serem menos imunogênicos que as IgGs devido a ausência da porção Fc (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998; GUTIERREZ; LEON; LOMONTE, 2003).

No Brasil, toda a demanda de soroterápicos utilizada na rede pública de saúde é produzida no Instituto Butantan (SP), Fundação Ezequiel Dias (MG), Instituto Vital Brazil (RJ) e Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos – CPPI (PR). Os soros podem ser específicos a determinado gênero de serpentes, como o Antibotrópico (SAB), Anticrotático (SAC), Antilaquético (SAL), Antielaquético (SAE) ou ainda, poliespecífico: Antibotrópico-laquético (SABL) (BRASIL, 2009, 2013).

A soroterapia monoespecífica é mais eficiente na neutralização do veneno quando comparada com a poliespecífica devendo ser administrada com base no diagnóstico clínico-epidemiológico gerado a partir das informações obtidas das vítimas, distribuição geográfica dos gêneros de serpentes e sintomas apresentados. Em regiões onde coabitam serpentes do gênero *Lachesis* e *Bothrops* faz-se necessário a disposição de soros poliespecíficos (SABL), uma vez que o soro anti-brotópico não é eficiente na neutralização do veneno laquético (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998; WEN, 2003).

O soro antiofídico é administrado em infusão lenta intravenosa com período de 20 à 60 minutos podendo ser diluído a critério médico em soro fisiológico ou glicosado na proporção 1:2 ou 1:5. A infusão lenta é recomendada, pois reduz a quantidade de soro injetado e permite controle das reações adversas imediatas. A dose administrada se baseia na identificação da serpente, intervalo entre a mordida e o tratamento, evolução clínica, título do soro utilizado e as instalações médicas disponíveis (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998). Nos

acidentes crotálicos, por exemplo, são administradas em média de 10 ampolas de SAC nos casos considerados moderados onde o paciente apresenta alterações neuromusculares evidentes com mialgia e mioglobínúria discreta. Nos casos graves onde a mialgia e mioglobínúria são intensas e acompanhadas de oligúria, recomenda-se a utilização de 20 ampolas (BRASIL, 2009). A dose e o volume total a ser administrado dependem diretamente da reversão dos sinais sistêmicos do envenenamento, como a restauração da coagulação sanguínea e desaparecimento efeitos hemorrágicos e neurotóxicos durante o tratamento (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998; WARRELL, 2012).

1.7 OS DESAFIOS DA SOROTERAPIA ANTIOFÍDICA

O elevado custo e a produção em nível industrial são grandes desafios à soroterapia convencional. Com um número relativamente baixo de laboratórios (45 instituições em 2010), a demanda de produção de soroterápicos mundial é suficiente para a realização de 600 mil tratamentos por ano. Entretanto, para atender a demanda mundial seriam necessários um número de ampolas suficiente para dois milhões de tratamentos (BROWN, 2012; GUTIÉRREZ, 2012). Além da quantidade de laboratórios a baixa produção está relacionada a fatores como a falta de animais, elevado custo de manutenção e inviabilidade de utilização de equinos em países endêmicos de zoonoses como tripanossomíase, anemia infecciosa e encefalopatia viral (BROWN, 2012; THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003). Consequentemente o custo da soroterapia é alto sendo estimado entre 8,00 e 1.338,00 dólares por ampola e 40,00 a 24.000 dólares o tratamento completo, constituindo um importante problema, sobretudo aos países não desenvolvidos (BROWN, 2012).

A segurança terapêutica dos soroterápicos pode ser comprometida por falhas no processo de produção que interferem na pureza do produto final. Os efeitos adversos reportados na administração de IgG, F(ab')₂ e Fab, apresentam uma ordem de 30 %, 10 % e 0,8 %, respectivamente. Sugere-se que falhas nas etapas de remoção de proteínas próprias do soro, porções Fc e a presença de endotoxinas são as principais causas dessas reações (THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003). Aproximadamente 10 % dos pacientes submetidos à soroterapia utilizando F(ab')₂ desenvolvem reações adversas que podem ser imediatas (dentro de algumas horas) ou tardias (cinco dias ou mais). O risco é geralmente

dose-dependente, com exceção dos casos sensibilização devido exposição prévia ao soro de equinos em terapia antitetânica ou antirábica (WARRELL, 2010).

As reações adversas imediatas (agudas) ocorrem no período de 10-180 minutos após administração do soro e o risco é aumentado conforme a dose e a velocidade de infusão (WARRELL, 2012). Podem ocorrer em pessoas sensibilizadas devido contato prévio com soro animal (reações anafiláticas) e também naquelas que nunca receberam soroterapia (reações anafilactóides) (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998). Os sintomas apresentados são: prurido intenso, urticária, tosse seca, náuseas, vômitos, cólica abdominal, diarreia, taquicardia e em casos mais graves hipotensão, broncoespasmo e angioedema (WARRELL, 2010).

As reações adversas tardias são também conhecidas como “doença do soro” e ocorrem entre 5 e 24 (em média 7) dias após a soroterapia. Os sintomas incluem febre, náuseas, vômitos, diarreia, prurido, urticária recorrente, artralgia, mialgia, linfadenopatia, inchaços periarticulares, proteinúria com presença de imunocomplexos, nefrite e mais raramente encefalopatias (WARRELL, 2010; 2012). Reações adversas também podem ocorrer devido à contaminação do antiveneno com endotoxinas pirogênicas durante sua produção. Os sintomas frequentes são calafrios, febre, vasodilatação, queda da pressão sanguínea e convulsões febris (THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003; WARRELL, 2010).

Outra desvantagem da soroterapia convencional é a ineficiência na neutralização de toxinas em compartimentos teciduais devido à diversidade de perfil farmacocinético das diferentes toxinas presentes no veneno de serpentes. Aquelas de pequeno tamanho molecular possuem maior biodisponibilidade que IgG e F(ab')₂, constituindo um importante problema principalmente pela incapacidade de reversão dos efeitos de miotoxinas e neurotoxinas (CHIPPAUX; GOYFFON; 1998; GUTIERREZ; LEON; LOMONTE, 2003). Além da alta capacidade de neutralização, o antiveneno ideal deve apresentar massa molecular semelhante a toxina alvo para que seu perfil farmacocinético possibilite a neutralização da toxina em seu local de ação (GUTIERREZ; LEON; LOMONTE, 2003).

1.8 ANTICORPOS DE CAMELÍDEOS

Animais da família Camelidae, ordem Artiodactyla, subordem Tylopoda (camelos, llamas e vicugna), além dos anticorpos convencionais IgG₁ com 150 kDa, apresentam anticorpos funcionais desprovidos de cadeias leves e domínios CH1, denominados de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos (HCAbs - IgG₂ e ₃) com aproximadamente 90 kDa. A interface de interação com antígenos é formada por uma única cadeia, o domínio variável da cadeia pesada de anticorpos de cadeia pesada, VHH ou nanocorpos (Nb) (HAMERS-CASTERMAN et al., 1993; MUYLDERMANS, 2013). A produção de HCAbs em camelídeos é definida por genes de imunoglobulinas G constantes (IGHG) específicos. A perda da cadeia CH1 ocorre por um processo de *splicing* durante o processamento do mRNA (MUYLDERMANS, 2013). A porcentagem de anticorpos de cadeia pesada em relação a IgG₁ é de 50-80 % em camelos e 10-25 % em espécies sul-americanas, (llamas e vicognas) (BLANC et al., 2009), demonstrando a importância desses anticorpos para a imunoproteção desses animais (MUYLDERMANS, 2013). As regiões de dobradiça de isotipos IgG₂ são mais longas do que as de IgG₃, com repetições de prolina com glutamina ou lisina, o que pode compensar a ausência de CH1, fornecendo angulação necessária para interação com antígenos (HAMERS-CASTERMAN et al., 1993).

O domínio VHH apresenta organização similar à VH de anticorpos convencionais. É constituído por três regiões hipervariáveis (CDR's 1, 2, 3) intercaladas por quatro regiões mais conservadas (*Framework* – FR 1, 2, 3 e 4) porém, com notáveis diferenças nas regiões FR2 e CDR's (CONRATH et al, 2003). Esses domínios de ligação a antígenos são expressos a partir de grupo de genes diferentes, dessa forma os aminoácidos hidrofóbicos (Val37, Gly44, Leu45, Trp47) presente em FR2 de VH, importantes para a ligação com VL, são substituídos por aminoácidos menores ou mais hidrofílicos (Phe/Tyr37, Glu/Gln44, Arg45, Gly/Phe/Leu47) em VHH (KOLKMAN; LAW, 2010; MUYLDERMANS, 2013; NGUYEN; MUYLDERMANS; HAMERS, 1998). As alças CDRs 1 e 3 em HCAbs de camelídeos são normalmente maiores para fornecer uma superfície de interação antígenoica compensatória a ausência do domínio VL (VU et al., 1997; MUYLDERMANS, 2013). Essa diferença é observada principalmente na CDR3 que possui em média 18 aminoácidos, enquanto a respectiva região em VH humano é constituída por cerca de 14 resíduos. Pontes dissulfeto com a CDR1 ou FR2 restringe a flexibilidade dessa proeminente alça, garantindo maior estabilidade (Figura 7) (VINCKE; MUYLDERMANS, 2012).

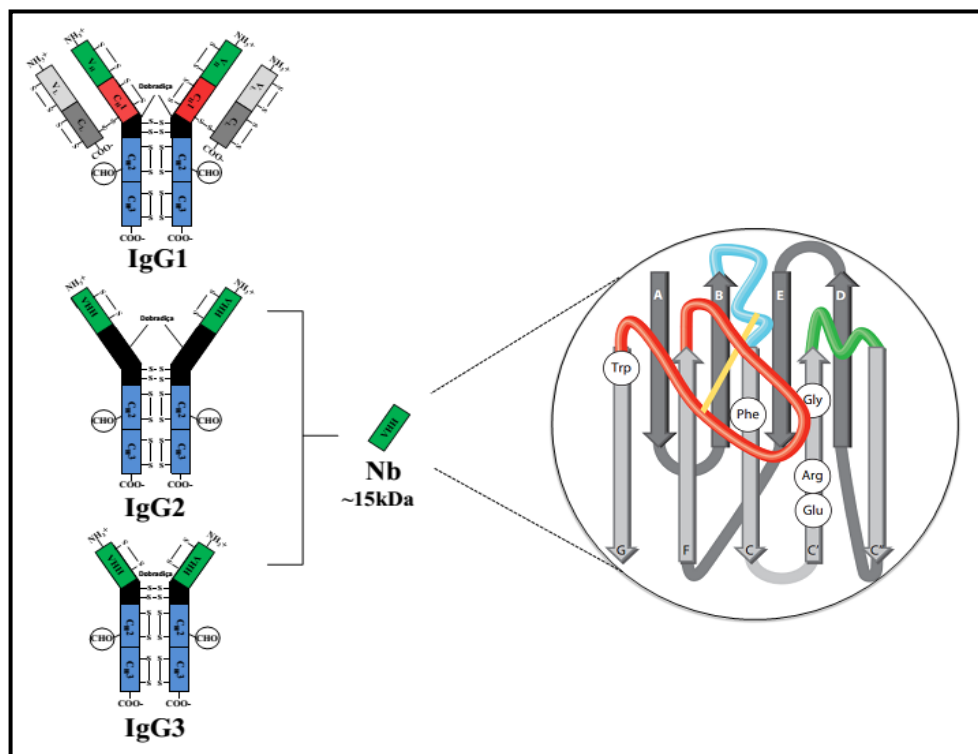


Figura 7: Domínios VHH de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos. IgG₂ e ₃ de camelídeos são desprovidas de CH1, cadeia leve e possuem uma única região de reconhecimento antigênico denominado VHH ou Nanocorpo (Nb). Em IgG₂ a ausência de CH1 é compensada por região de dobradiça mais prolongada. Diferente da região variável da cadeia pesada de anticorpos convencionais o VHH apresenta importantes trocas de aminoácidos hidrofóbicos por hidrofílicos na FR2 (em destaque), além de alças CDR1 e 3 mais prolongadas (vermelho e azul). A CDR3 é estabilizada por pontes dissulfeto (amarelo) com CDR1 ou FR2 (Adaptado de KUBY et al., 2007; MUYLDERMANS, 2013).

1.9 NANOCORPOS DERIVADOS DE HCABS

O repertório gênico de domínios VHH de HCABs de camelídeos pode ser recombinado em vetor, clonado e expresso na forma solúvel utilizando a tecnologia de DNA recombinante, resultando em fragmentos com alta especificidade e afinidade antigênica, com tamanho na escala nanométrica e com massa molecular próxima de 15 kDa (GHAHROUDI et al., 1997; VINCKE; MUYLDERMANS, 2012).

As regiões conservadas FRs dos nanocorpos possuem mais de 80 % de similaridade com as de VH humano, diferenciando-se em especial nas substituições de aminoácidos hidrofóbicos por hidrofílicos nas regiões variáveis FR2, e nas regiões hipervariáveis CDRs (MUYLDERMANS; CAMBILLAU; WYNS, 2001). Esta alta similaridade justifica a baixa

imunogenicidade humoral e celular desses fragmentos, resultando na ausência de anticorpos específicos, proliferação de linfócitos e produção de INF- γ , observada em ratos, após administração (CORTEZ-RETAMAZO, 2002). O pequeno tamanho, alta estabilidade e depuração renal elevada, também contribuem para a baixa imunogenicidade (MUYLDERMANS, 2013).

Quando comparado com fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) ou ligados por pontes dissulfeto (dsFv), os nanocorpos apresentam maior estabilidade térmica, mantendo atividade de ligação entre 80-100 %, mesmo quando pré-incubado a 37 °C por 60 horas (GHAHROUDI et al., 1997). Isso se deve a grande estabilidade conformacional e maior capacidade de remodelamento mesmo depois de exposição a temperaturas desnaturantes (60 - 80 °C). Em temperaturas elevadas os fragmentos de anticorpos convencionais expõem as interfaces hidrofóbicas entre VH-VL, induzido agregação e precipitação. Possivelmente a elevada estabilidade térmica dos nanocorpos deve-se a substituição de aminoácidos hidrofóbicos por mais hidrofílicos em relação ao VH (DUMOULIN, et al., 2002).

A seleção de nanocorpos pode ser realizada empregando a tecnologia *phage display* que consiste na construção de bibliotecas de bacteriófagos expressando proteínas de interesse fusionadas em sua superfície e seleção de acordo com a afinidade com alvo desejado (GHAHROUDI et al., 1997; HMILA et al., 2008; PANDE; SZEWCZYK, GROVER, 2010). Analisando as características apresentadas pelos fragmentos de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos, juntamente com a necessidade de produção de antivenenos menos imunogênicos, capazes de neutralizar toxinas em tecidos profundos e reverter os efeitos neurotóxicos e miotóxicos sistêmicos, este trabalho propõe a seleção e caracterização parcial de nanocorpos por *phage display*, ativos contra crotoxina e suas frações CA e CB, obtidas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar parcialmente nanocorpos de *Lama glama* que reconheçam a proteína crotoxina e suas frações (CA e CB), obtidas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir uma biblioteca recombinante de VHH em cepa bacteriana *E.coli* TG1;
- Selecionar por meio da técnica *phage display* clones VHH que reconheçam especificamente crotoxina, CA e CB;
- Caracterizar os clones selecionados por PCR e ensaios imunienzimáticos;
- Analisar e caracterizar *in silico* as sequências dos clones selecionados;
- Expressão e purificação do VHH selecionado por cromatografia de afinidade;
- Verificar a reatividade cruzada entre o anti-CB VHH e venenos e toxinas de serpentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A construção da biblioteca primária de VHH e a seleção de clones ativos contra crotoxina, CA e CB foi realizada utilizando a técnica de *phage display*. Métodos de biologia molecular, bioquímica e bioinformática foram empregados para a caracterização dos clones VHH selecionados (Figura 8).

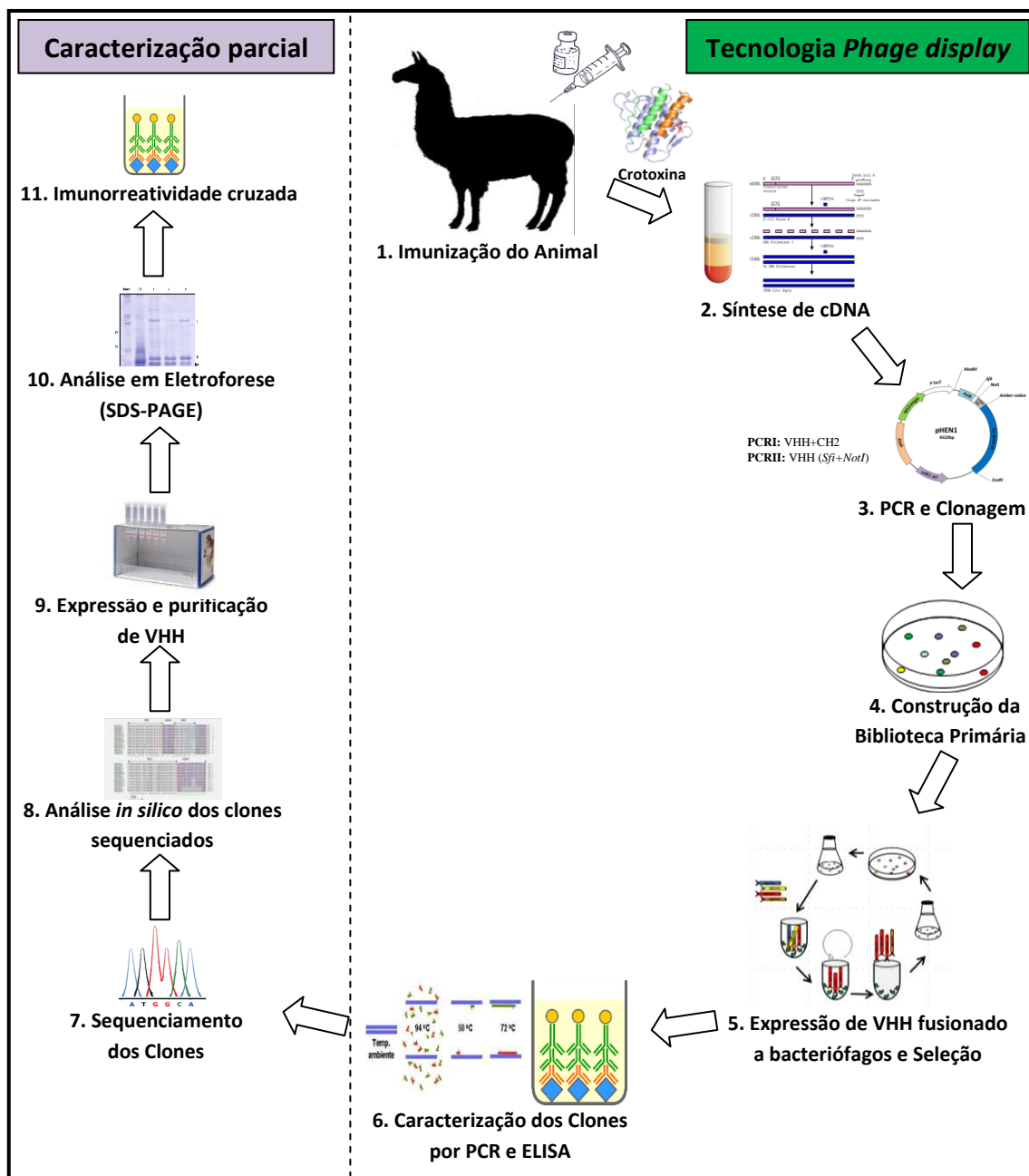


Figura 8: Estratégia metodológica empregada na seleção e caracterização de VHH ativos contra crotoxina, subunidades CA e CB de *Crotalus durissus terrificus*. 1. Monitoramento da resposta imune do animal após administração subcutânea de crotoxina, CB e CA; 2. Síntese de cDNA a partir de RNA total extraído de linfócitos periféricos; 3. Amplificação do repertório gênico de VHH por RT-PCR, digestão enzimática com *SfiI* e *NotI*, e recombinação em vetor fagomídeo pHEN1; 4. Construção da biblioteca primária de VHH após clonagem do vetor recombinado em bactéria *E.coli* TG1; 5. Expressão de VHH fusionado a proteína III de capsídeo do fago auxiliar VCSM13 e seleção de clones específicos por afinidade às toxinas; 6. Caracterização dos clones por PCR e verificação de afinidade em ELISA; 7. Sequenciamento dos clones com melhor afinidade; 8. Análise dos clones sequenciados por bioinformática; 9. Expressão de VHH em forma solúvel e purificação por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto; 10. Análise eletroforética em SDS PAGE; 11. Imunorreatividade cruzada.

3.1 ANIMAL EXPERIMENTAL

Um indivíduo *Lama glama*, macho, jovem, adulto, mantido sob as condições climáticas locais em estábulo e cuidados da Plataforma de Criação e Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia - PCEA-RO. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz Rondônia (CEUA: 2012-11).

3.2 REAGENTES

A crotoxina e suas frações CA e CB foram purificadas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde (CEBio) da Universidade Federal de Rondônia (UNIR)/Fiocruz RO. O anticorpo de coelho anti-VHH, produzido na Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, foi cedido pelo Dr. Rodrigo Stábeli e o conjugado com peroxidase anti-IgG de coelho obtido da empresa Sigma-Aldrich, EUA. Para clonagem e expressão do VHH foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* TG1 adquiridas da empresa Stratagene, EUA (cepa eletrocompetente- K12 (lac-pro), supE, thi, hsdD5/F, traD36, proAB, lacIq, LacZAM15) e cepa HB2151 (araD (lac pro AB), lacI^q Δ(lacZ) M15, thi/F'proA⁺B⁺/fhua2Δ(thiΔ(hsdMS merB)(⁻r_k⁻m_k⁻McrBC⁻) K12), cedidas pelo Dr. Gerhard Wunderlich do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O repertório imune de VHH obtido do espécime animal foi recombinado em vetor fagomídeo pHEN1 cedido pelo Dr. Pierre Lafaye (Instituto Pasteur, Paris), para construção da biblioteca primária. A biblioteca secundária foi produzida após infecção com fago auxiliar VCSM13 (Stratagene, EUA). A purificação do VHH por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto foi possível após subclonagem dos VHHs selecionados em vetor pHEN1 carreando seis resíduos de histidina (pHEN1-6HIS), inseridos por mutagênese sítio dirigida.

3.3 IMUNIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DO ANIMAL POR ELISA

Após verificação da sanidade animal por meio de exames hematológicos e bioquímicos, o espécime *Lama glama* foi imunizado semanalmente com doses crescentes de crotoxina, CB e CA por via subcutânea individual, com incremento de adjuvante de Freund completo e incompleto (Quadro 1) e volume final de 500 µL completado com água de injetáveis.

Quadro 1 - Esquema de imunização do espécime *Lama glama* com crotoxina, CA e CB.

IMUNIZAÇÃO	DOSE (µg)			ADJUVANTE Freud (µL)
	CTX	CA	CB	
1ª Semana (dia 01)	100	50	50	Não
2ª Semana (dia 07)	100	50	50	50 – Completo
3ª Semana (dia 14)	200	100	100	100 – Incompleto
4ª Semana (dia 21)	200	100	100	100 – Incompleto
5ª Semana (dia 28)	200	100	100	100 – Incompleto

A resposta imune do animal foi monitorada por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA. Placas de poliestireno de 96 poços do tipo Nunc-MaxiSorp (eBioscienc -EUA) foram adsorvidas com 100 µL de uma solução de 10 µg/mL de crotoxina, CB e CA em tampão PBS (NaCl 1,37 M, Na₂HPO₄.12H₂O 8.5×10⁻² M, KH₂PO₄ 1.5×10⁻², KCl 2.7×10⁻², pH 7.4) e incubadas por 24 horas à 4 °C. Após lavagem com tampão PBST (tween 0,05 % em PBS) por 3 vezes, os sítios remanescentes foram bloqueados pela adição de 250 µL de solução de bloqueio (5 % de leite desnatado em PBS) em cada poço e incubação a 4 °C por 5 horas. Após lavagem com PBST, foram adicionados 100 µL/poço de diferentes diluições do soro do animal em solução de bloqueio, incubando a 4 °C por 24 horas. O anticorpo de coelho anti-VHH foi diluído 1:12.000 (v/v) em solução de bloqueio e adicionados 100 µL/poço, logo após a lavagem da placa com PBST. A placa foi incubada a 4 °C por 24 horas. Uma nova lavagem foi realizada e em seguida adicionados 100 µL/poço do anti-IgG de coelho conjugado com

peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), previamente diluído 1:40.000 (v/v) em solução de bloqueio, mantendo-se incubação por 5 horas. A placa foi novamente lavada com PBST e a revelação realizada com 100 µL/poço de Tetrametilbenzidina (TMB, Millipore, EUA) e 100 µL de ácido sulfúrico 0,32 M para o bloqueio da reação após 30 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro (Synergy-HT, Biotek, EUA). O controle negativo correspondeu as absorbâncias de poços onde não foi adicionado a diluição do soro animal e o positivo aquele com a diluição mínima do soro (1:1.000 v/v). Os dados foram tabulados no programa GraphPad Prism 5 2007® e o “cut-off” foi estabelecido como três vezes o desvio padrão das amostras mais três vezes a média do controle negativo [$3 \times \text{Desv. pad} + 3 \times \text{Média C-}$]. As amostras (diluições do soro) foram testadas em duplicata.

3.4 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA PRIMÁRIA DE VHH

3.4.1 Extração de linfócitos

Após obtenção do título de resposta imune positiva na diluição do soro ($1:1 \times 10^6$ v/v) foram coletados 50 mL de sangue do animal em tubo falcon contendo EDTA 3M (pH 6,7) para o isolamento de linfócitos. A amostra foi diluída na proporção de 1:1 (v/v) em solução balanceadora (D- Glicose Anidra 0,1 %, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $5,0 \times 10^{-5}$ M, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $9,8 \times 10^{-4}$ M, KCl $5,4 \times 10^{-3}$ M, Tris Base 0,145 M e NaCl 0,14 M, pH 7,6) e adicionado cuidadosamente em tubos contendo o reagente *Ficoll-Paque PLUS*® (Amersham Biosciences, Reino Unido) na proporção de 1:1 (v/v). Os tubos foram centrifugados a 400 $\times g$ por 30 minutos a 20°C. A interface média do gradiente de centrifugação foi coletada e transferida para um novo tubo com solução balanceadora na proporção de 1:3 (v/v). O material foi centrifugado a 100 $\times g$ por 10 minutos a 20 °C, o precipitado celular solubilizado em 6 mL de solução balanceadora e centrifugado nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspenso em volume final de 1 mL de solução balanceadora. Uma alíquota foi diluída 1:20 (v/v) em solução de Turk para contagem de linfócitos em microscópio óptico com objetiva de 40x, utilizando câmara de Neubauer.

3.4.2 Extração de RNA

A lise celular ocorreu após homogeneização da suspensão de linfócitos (1 mL) em 3 mL do reagente *Trizol*® (Invitrogen, EUA), com auxílio de pipeta de Pasteur. Após incubação a temperatura ambiente por 5 minutos, foram acrescentados 600 µL de clorofórmio, homogeneizando no vórtex por 15 segundos e novamente incubando o material em temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida o material foi centrifugado a 12.000 *xg* por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa (RNA total) transferida para um novo tubo onde se adicionou 1500 µL de isopropanol, mantendo em temperatura ambiente por 10 minutos. O material foi centrifugado a 12.000 *xg* por 10 minutos a 4 °C e o precipitado ressuspendido com 3 mL de etanol 75 %. Centrifugou-se a 7.500 *xg* por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi removido com auxílio da bomba de vácuo. O precipitado foi solubilizado em 50 µL de água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC, Invitrogen, EUA), e incubado a 55 °C por 10 minutos em banho-maria. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria, aliquoteado e armazenado a -80 °C.

3.4.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, EUA). Aproximadamente 2 ng de RNA total foram adicionados a um *mix* contendo 1 µL de dNTP 2 mM, 1 µL de *Hexa Random Primer* (50 ng/µL) e água tratada com DEPC suficiente para volume final de 10 µL. Um segundo *mix* foi preparado contendo 2 µL *RT buffer* 10X, 4 µL MgCl₂ 25 mM, 2 µL DTT 0,1M, 1 µL RNaseOUT (40 U/µL) e 1 µL de *SuperScript III RT* (200 U/µL). Após incubação por 5 minutos a 65 °C e em gelo por 1 minuto, o primeiro *mix* foi misturado ao segundo e incubado por 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 50 °C e 5 minutos a 85 °C no termociclador. No final da reação foi adicionado 1 µL de RNase H (2U/µL) e a temperatura mantida a 37 °C por 20 minutos. O cDNA foi aliquoteado e armazenado a -20 °C.

3.4.4 Reação em Cadeia da Polimerase: Amplificação do repertório gênico VHH

O cDNA sintetizado foi submetido a uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando *primers* VHBACKA6 e CH2FORTA4 (GHAHROUDI et al.,1997) que amplificam as regiões gênicas VH-CH1-CH2 das imunoglobulinas convencionais e VHH-CH2 das imunoglobulinas de cadeia pesada do camélídeo (Figura 9). Vinte microlitros de cDNA diluído 1:10 (v:v) foram adicionados em um *mix* contendo 19,9 µL de *Buffer 10x*, 4 µL de cada *primers*, 4 µL de dNTPS 2,5mM, 1,5 µL de enzima *Hotmaster Taq Polimerase* (5 prime, Alemanha) e água para um volume final de 180 µL. O termociclador foi programado para 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e 10 minutos a 72 °C para extensão final. O produto da reação foi submetido a análise eletroforética em gel de agarose 1,5 % com amperagem fixa (250 mA). Em seguida, somente o fragmento de aproximadamente 600 pares de bases (pb), correspondente aos domínios VHH-CH2 de anticorpos de cadeia pesada, foi excisado do gel. Após purificação utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Banda Purification* (GE Healthcare, EUA) foi realizada uma nova reação de PCR utilizando os *primers* VHFOR36 e VHBACKA4 (GHAHROUDI et al.,1997), que além de amplificar somente o fragmento gênico correspondente ao domínio VHH dos anticorpos de cadeia pesada de camélídeos, inserem nas regiões 5' e 3' das sequências, sítios para as endonucleases de restrição *SfiI* e *NotI* (Figura 10). O volume de 9 µL do material purificado após primeira PCR previamente diluído 1:1000 (v:v) foi adicionado em um *mix* contendo 10,4 µL de *Buffer 10x*, 2,1 µL de cada *primer*, 2,1 µL de dNTPS 2,5 mM, 0,8 µL de enzima *Hotmaster Taq Polimerase* e água para um volume final de 81 µL. Nesta fase foi utilizada a seguinte programação no termociclador: 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 45 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e 10 minutos a 72 °C para extensão final. Após purificação o material foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5 % para visualização e quantificação, utilizando como referência o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, EUA).

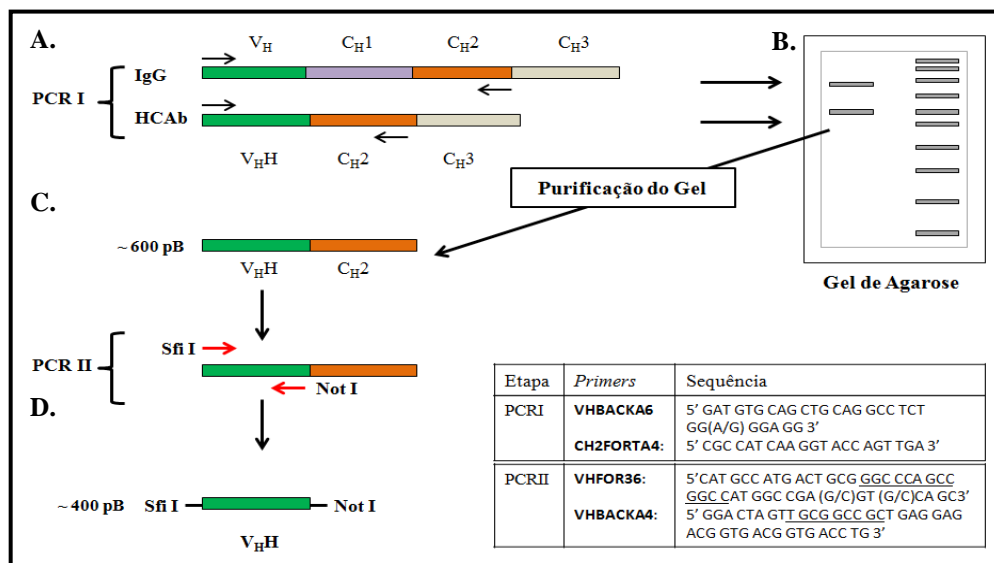


Figura 9: Estratégia de clonagem e isolamento do Fragmento VHH por RT-PCR. O fragmento VH-CH1-CH2 (900 bp) de IgG convencional e VHH-CH2 (600 bp) de anticorpos de cadeia pesada foram amplificados na PCR I usando cDNA produzido a partir de RNA total do camélido imunizado (A.). O produto com 600 pb foi excisado do gel (B.), purificado e submetido a PCR II (C.) para amplificação do domínio VHH e inserção dos sítios de restrição para as enzimas *Sfi*I e *Not*I (D.) (sequência sublinhada) (Adaptado de RICHARD, 2009).

3.4.5 Obtenção de *Escherichia coli* eletrocompetentes, cepas TG1 e HB2151

A preparação de cepas TG1 e HB2151 de *E. coli* eletrocompetentes foi necessária para posterior construção da biblioteca primária e expressão de VHHs selecionados na forma solúvel. Uma colônia de cada cepa foi inoculada em 15 mL de meio LB (Invitrogen, EUA) e incubado *overnight* a 37 °C no *shaker* a 250 rpm. Uma alíquota de 500 µL de cada cultura foi transferida para 500 mL de meio LB líquido e incubado a 37 °C no sob agitação (250 rpm), até a densidade óptica de 0,5 no comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀). As culturas foram resfriadas no gelo por 30 minutos e centrifugadas a 4.500 *xg* por 15 minutos a 4 °C em frascos de 250 mL. O sobrenadante foi descartado, o pellet bacteriano ressuscitado em 250 mL de solução de glicerol 10 % (glicerina 10 % em água destilada autoclavada) e centrifugado 4.500 *xg* por 15 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuscitado em 20 mL de glicerol 10 % e, após nova centrifugação, recuperado em 1 mL da mesma solução. A suspensão celular foi armazenada a - 80 °C em alíquotas de 40 µL.

3.4.6 Digestão e recombinação do repertório gênico VHH em vetor pHEN1

O fagomídeo pHEN1 (Figura 10) é derivado do vetor Puc119 e possui, além da origem de replicação de fago M13 (*M13 origin*) e de bactérias (*colER1*), sítios de digestão para enzimas *SfiI* e *NotI* entre a região que codifica o pepetideo sinal de exportação para periplasma (*PelB*) e a glicoproteína III fágica (*fd-gene III*). Antecedendo a região *Fd-gene III* está o marcador de identificação *c-myc tag* e também o *amber stop codon* (*TAG*), o qual é transcrito como aminoácido glutamina por bactérias não supressora de *stop codon* (genótipo *supE*) como a *E. coli* TG1, possibilitando a expressão do VHH fusionado a glicoproteína III (gpIII). A expressão de VHH de forma solúvel não conjugada a gpIII é realizado em cepas não supressoras como a *E. coli* HB2151. A expressão é regulada pelo promotor *LacZ* e a presença do marcador de resistência a ampicilina (*AMP*) facilita o processo de seleção de colônias transformadas (HOOGENBOOM et al., 1991).

O produto da PCRII (repertório gênico de VHH) e o vetor fagomídeo pHEN1 foram submetidos a digestão utilizando as enzimas *NotI* HF e *SfiI* (New England Biolabs, Alemanha). Um volume de 16 µL de PCRII (50 ng/µL) foram adicionados em um *mix* contendo 5 µL de *buffer 4-NE*, 0,5 µL de BSA, 4 µL da enzima *NotI* HF (20.000 U/mL) e 24,5 µL de água de injetáveis. Após homogeneização o material foi incubado a 37 °C por 8 horas. Em seguida foram adicionados 4 µL de enzima *SfiI* (20.000 U/mL) a solução, mantendo-se a temperatura de 50 °C por 8 horas. Para a digestão do vetor, foram utilizados 18,7 µL de pHEN1 (214 ng/µL), 10 µL de *buffer 4-NE*, 1 µL de BSA, 4 µL da enzima *NotI* HF (20.000 U/mL) e 66,3 µL de água injetáveis, submetendo-se a solução as mesmas condições de digestão do inserto. Ao término da reação de digestão do vetor, foi adicionado 1 µL da enzima CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Fermentas, Canadá), mantendo-se por 1 hora a 37 °C. Depois disso a enzima foi inativada com aumento da temperatura para 85 °C por 10 minutos. O produto da digestão foi purificado utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Banda Purification* e quantificado em eletroforese em gel de agarose utilizando marcador de referência *Low DNA Mass Ladder*. A ligação dos produtos da digestão foi realizada utilizando enzima *T4 DNA ligase* (Promega, EUA). Em um *mix* contendo 2 µL da enzima (3 U/µL), 25 µL de *2X Rapid ligation buffer* e 3,8 µL de água, foram adicionados 16,6 µL de inserto (30 ng/µL) e 2,5 µL do vetor (100 ng/µL). A reação foi incubada a 4 °C por 18 horas e purificada conforme kit.

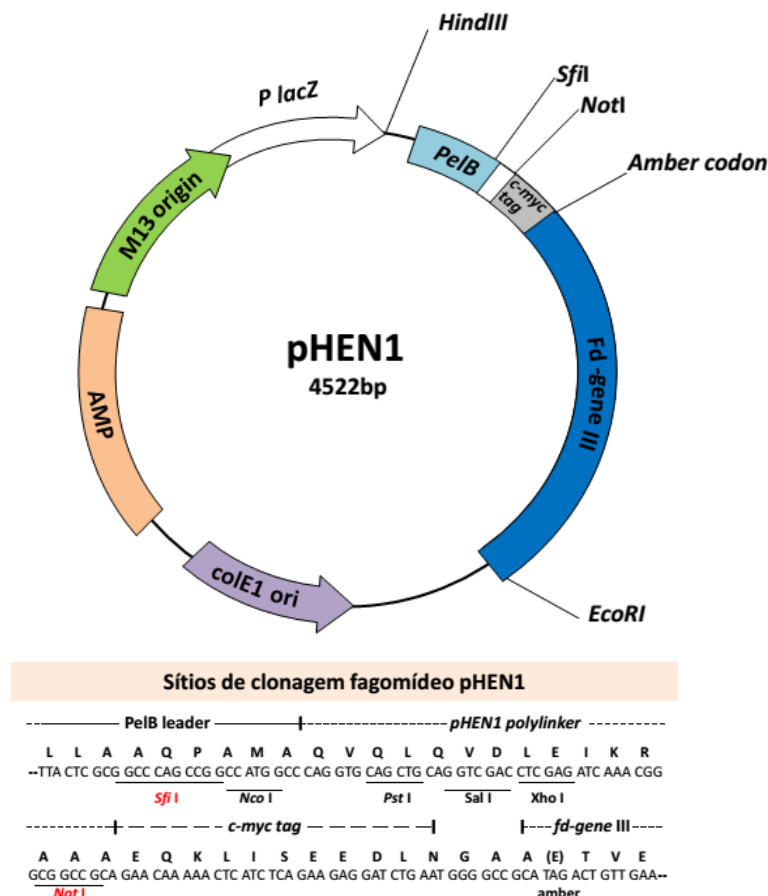


Figura 10: Organização estrutural do fagomídeo pHEN1. Estrutura organizacional do vetor fagomídeo pHEN1 utilizado para clonagem do repertório gênico VHH contendo gene do peptídeo sinal *PelB*, sítios de restrição para as enzimas *SfiI* e *NotI* (em vermelho), *c-myc tag*, *stop codon amber*, *Fd-gene III*, origem de replicação de fago (*M13 origin*) e bactéria *E. coli* (*colE1 ori*), além do marcador de resistência a ampicilina (*AMP*) e promotor *lacZ* (Adaptado de HOOGENBOOM et al, 1991).

3.4.7 Transformação em *E. coli* TG1 e titulação da biblioteca

A transformação bacteriana com o repertório gênico de VHH recombinado em vetor pHEN1 foi realizada por eletroporação. Em 40 µL de cepas *E. coli* TG1 eletrocompetente (previamente incubada no gelo por 10 minutos) foi adicionado 1 µL da ligação e após leve homogeneização, o material foi transferido para cubeta de eletroporação de 0,1 cm (BioAgency), mantido no gelo por 1 minuto e seguida eletroporado (MicroPulser, Bio-Rad, EUA) com pulso de 1,8 kV e duração média entre 4,9 - 5,3 milissegundos. Imediatamente após eletroporação, foram acrescentados 960 µL de meio SOC (Tripton, Extrato de Levedura, NaCl, Glicose 20 %, MgCl₂ 1M e MgSO₄ 1M) as cubetas e a suspensão celular transferida para microtubos e incubada sob agitação (250 rpm), por 1 hora a 37 °C. Após

centrifugação a 1.793 $\times g$ por 15 minutos, o pellet bacteriano foi ressuspenso em meio 2YT líquido (Invitrogen, EUA) e plaqueado em placa de 30 x 30 cm contendo meio sólido 2YT com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina (Sigma-Aldrich, EUA). Foram realizadas 42 transformações. A cultura foi incubada em estufa bacteriológica a 30 °C por 16 horas, em seguida transferida para meio líquido 2YT ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$, glicose 2 % e glicerol 15 % (2YT amp/glu/glic15 %) e armazenada a -80 °C.

O título da biblioteca primária foi determinado por diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-6} , partindo da diluição de 10 μL em 990 μL de 2YT líquido. Foram plaqueados 100 μL de cada diluição em meio sólido de 2YT amp/glu e incubado a 37 °C por 16 horas. O título correspondeu ao número de colônia multiplicado pelo fator de diluição vezes o volume plaqueado. A eficiência da ligação foi observada por PCR de colônia utilizando os *primers*: PHEN1F1 (5'GAAATACCTATTGCCTACGGCA3') e PHEN1R1 (5'GACAGCCCTCATAGTTAGC GTA3'). Colônias isoladas foram alçadas e submetidas a um *mix* contendo 1 μL de *Buffer 10x*, 1 μL da diluição dos *primers* (2,5 pMol/cada), 1 μL de dNTPS 2,5mM, 0,15 μL de enzima *Hotmaster Taq Polimerase* e água q.s.p 10 μL . O material foi submetido a seguinte programação no termociclador: 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos e 10 minutos a 72 °C para extensão final. A amplificação foi evidenciada em eletroforese em gel de agarose 1,5 % com amperagem fixa (250mA) e as bandas determinadas de acordo com o marcador de peso molecular *PCR 100pb low ladder* (Sigma-Aldrich, EUA).

3.5 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA SECUNDÁRIA DE VHH

Uma alíquota de 100 μL da biblioteca primária de VHH em *E. coli TG1* foi inoculada em 500 mL de meio líquido de 2YT amp/glu atingindo densidade óptica inicial de 0,04 no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}). A cultura foi incubada a 37 °C no *shaker* sob agitação (250 rpm) e a densidade óptica foi monitorada até 0,5 quando foi adicionado 500 μL do bacteriófago VCSM13 ($\text{DO}_{270} = 1.0$) para infecção. Após 1 hora sem agitação e 1 hora sob agitação, 1 μL do material foi diluído em 1 mL de meio 2YT líquido e plaqueado 10 μL em meio sólido 2YT amp/glu/agar 1,5 % e em 2YT kanamicina 25 $\mu\text{g/mL}$ (Invitrogen, EUA), glicose 2 %, agar bacteriológico 1,5 % (2YT kana/glu/agar 1,5 %). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 16 horas. O objetivo foi verificar a eficiência da

infecção. O VCSM13 possui marcador de resistência a kanamicina, o crescimento de células infectadas em meio com esse antibiótico é 10 % maior quando comparado com crescimento de células com o vetor pHEN1 em placa contendo ampicilina (BRADBURY; MARKS, 2004).

O volume total de cultura foi transferido para frascos de 250 mL, centrifugado a 2.213 \times g por 10 minutos a 17 °C e o pellet bacteriano ressuscitado em 500 mL meio líquido 2YT amp/kana e incubado a 25 °C *overnight*. A cultura foi submetida à centrifugação a 24.596 \times g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido a um erlenmeyer no qual foi adicionado também solução aquosa com 20 % Polietilenoglicol 6000 e 2,5M de Cloreto de sódio (PEG 20 % NaCl 2,5M), na proporção 5:1 (v/v). Incubou-se o sobrenadante a 4 °C por 5 horas. O material foi então centrifugado a 3.935 \times g por 15 minutos a 4 °C e o precipitado ressuscitado em solução com 20 mL de PBS e 5 mL de PEG 20 % NaCl 2,5M incubando-se por mais 1 hora a 4 °C. Após centrifugação a 3.935 \times g por 15 minutos a 4 °C, os fagos precipitados foram eluídos com 1,5 mL de PBS correspondendo a biblioteca secundária. O título desta biblioteca foi determinado por diluição seriada de 10^{-2} a 10^{-6} , partindo da diluição de 5 μ L em 495 μ L de 2YT líquido. As diluições foram utilizadas para infectar 500 μ L de cultura bacteriana *E. coli TGI* em 2YT líquido ($DO_{600} = 0.5$), as quais foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e em seguida 10 μ L foram plaqueados em meio sólido de 2YT/amp/glu/agar 1,5 %. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas. O título (ufc/mL) foi determinado como o número de colônias vezes o fator de diluição vezes o volume plaqueado.

3.6 SELEÇÃO DE FAGOS RECOMBINANTES CONTENDO VHH FUSIONADO A GLICOPROTEÍNA III

Para a seleção dos fagos com VHH fusionado a glicoproteína III do capsídeo, imunotubos do tipo Nunc-MaxiSorp (Thermo Scientific, EUA) foram adsorvidos individualmente com solução de 1 mg/3mL das frações CA, CB e crotoxina em PBS e mantidos sob homogeneização constante em temperatura ambiente por 48 horas. Após lavagem com PBS por 3 vezes, foram adicionados 3 mL de solução de bloqueio (5 % leite desnatado em PBS) em cada imunotubo, mantendo-os sob homogeneização por 4 horas. A biblioteca secundária foi diluída em 7,5 mL de solução de bloqueio e mantida sob homogeneização por 30 minutos. Após descarte da solução, foram adicionados 3 mL da

diluição da biblioteca secundária em cada imunotubo mantendo-os a temperatura ambiente por 30 minutos e depois sob agitação por mais 30 minutos. Os imunotubos foram lavados 15 vezes com PBS-Tween 0,05 % e 15 vezes com PBS para retirada dos fagos que não interagiram com os antígenos adsorvidos. Para a eluição dos fagos remanescentes a lavagem, foi adicionado 1 mL solução ácida de HCl 100 mM, mantendo-os sob agitação por 8 minutos. A solução foi neutralizada com 1 mL de Tris-HCl 1M, pH 7,5. Para amplificação dos fagos selecionados, o eluído foi utilizado para infecção de 10 mL de cultura de *E. coli* TG1 ($A_{600} = 0,5$) em meio 2YT líquido, mantendo-se incubado a 37° por 30 minutos parado e 30 minutos sob homogeneização. Após centrifugação a 3.935 xg por 15 minutos, o pellet bacteriano foi ressuspensionado em 1 mL de meio 2YT líquido, plaqueado igualmente em meio sólido 2YT/amp/glu/agar 1,5 % e incubado a 30 °C por 16 horas. A cultura foi transferida para o meio líquido 2YT amp/glu/glicerol 15 % e armazenada a -80 °C até o início de uma nova etapa de seleção. Foram realizadas três rodadas de seleção (*panning*).

3.7 CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES: PCR, ELISA E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Ao final de cada rodada de *panning*, colônias isoladas foram selecionadas para realização de PCR conforme seção 3.4.7. A capacidade de reconhecimento dos clones positivos na PCR foi avaliada por ELISA. Colônias foram inoculadas em microtubos contendo 1,5 mL de meio 2YT/amp/glu 0,1 % e incubadas sob agitação (250 rpm) a 37 °C até densidade óptica de 0,9 no comprimento de onda de 600 nm, quando foi adicionado 1mM de indutor de expressão *Isopropil- β -D-thiogalactopiranosideo* (IPTG, Promega, EUA) e mantido por 16 horas a 30 °C sob agitação. Os microtubos foram centrifugados a 1.793 xg por 15 minutos e o sobrenadante recuperado. Placas de poliestireno de 96 poços do tipo Nunc-MaxiSorp foram adsorvidas com 100 μ L da solução de crotoxina, CB e CA em tampão PBS (10 μ g/mL) e incubadas por 24 horas a 4 °C. Após lavagem por três vezes com PBST, os sítios remanescentes foram bloqueados com adição de 250 μ L de solução de bloqueio por poço e incubação da placa 4 °C por 5 horas. Após nova lavagem com PBST, adicionou-se 200 μ L/poço da diluição do sobrenadante dos clones em solução de bloqueio 1:1 (v/v), incubando a 4 °C por 24 horas. O anticorpo de coelho anti-VHH foi diluído 1:12.000 (v/v) em solução de bloqueio e adicionado 100 μ L em cada poço, logo após a lavagem da placa com PBST. Incubou-se a placa a 4 °C por 24 horas. Após lavagem com PBST, foram adicionados 100

μL/poço do anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, previamente diluído 1:40.000 (v/v) em solução de bloqueio, mantendo-se incubação por 5 horas. A placa foi novamente lavada com PBST e a revelação realizada com 100 μL/poço de TMB e 100 μL de ácido sulfúrico 0,32 M para o bloqueio da reação após 30 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro. O controle negativo correspondeu a absorbância de poços onde não foram adicionados o sobrenadante de cultura e o positivo aqueles em que foram adicionados diluição mínima do soro (1:1.000 v/v). As amostras foram testadas em duplicata. Os dados foram tabulados no programa GraphPad Prism 5 2007® e o “*cut-off*” foi estabelecido: $[3 \times \text{Desv. pad} + 3 \times \text{Média C-}]$.

A extração de DNA plasmidial dos clones que apresentaram melhores absorbâncias foi realizada conforme kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen, EUA). Após quantificação por espectrofotometria, 20 μL (0,2 μg/μL) de cada clone foi enviado para sequenciamento na Fundação Oswaldo Cruz – Bahia (eletroforese capilar - ABI PRISM 3100, Applied Biosystems, EUA). Os resultados foram analisados *in silico* utilizando os softwares DNASTar (Lasergene, EUA), Chromas LITE (Technelysium, Austrália) e ClustalW2 (Ebi.ac.uk, Reino Unido).

3.8 SUBCLONAGEM DOS CLONES SELECIONADOS EM VETOR pHEN1-6HIS E TRANSFORMAÇÃO EM *E.coli* HB2151

Os fragmentos gênicos dos clones analisados *in silico* foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *Sfi*I e *Not*I-HF a partir do DNA plasmidial (miniprep), purificados e recombinados em vetor fagomideo pHEN1-6HIS, o qual foi subclonado em cepa não supressora de *stop codon* *E. coli* HB2151. Este procedimento possibilita a expressão do VHH na forma solúvel não conjugado à glicoproteína III fágica e também a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto a partir da interação dos resíduos de histidina com este metal. Para a digestão do inserto, 3 μL de DNA plasmidial de cada clone (333 ng/μL) foram adicionados a um *mix* contendo 5 μL de *buffer 4-NE*, 0,5 μL de BSA, 1 μL da enzima *Not*I HF (20.000 U/mL) e 40,5 μL de água. Após homogeneização o material foi incubado a temperatura constante de 37 °C por 8 horas. Adicionou-se 4 μL da enzima *Sfi*I (20.000 U/mL) e a temperatura foi aumentada para 50°C e mantida por 8 horas. Para a digestão do vetor foram utilizados 12,5 μL de pHEN1-6HIS (120 ng/μL), 10 μL de *buffer 4-*

NE, 1 μ L de BSA, 4 μ L da enzima *NotI* HF (20.000 U/mL) e 22,5 μ L de água, o qual foi submetido as mesmas condições de digestão do inserto. Ao término da reação, foi adicionado 1 μ L da enzima CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* – Fermentas, CANADÁ) no *mix* de digestão do vetor, mantendo-se por 1 hora a 37 °C e subsequentemente a temperatura foi aumentada para 85 °C por 10 minutos, promovendo a inativação enzimática. Após digestão plasmidial, o fragmento gênico correspondente ao VHH foi excisado do gel de eletroforese em agarose 1,5 % e purificado utilizando o kit *GE-GFX PCR DNA and Gel Band purification*. A ligação no vetor pHEN1-6HIS foi realizada utilizando enzima *T4 DNA ligase*. Em um *mix* contendo 1 μ L da enzima (3 U/ μ L) e 32 μ L de *2X Rapid ligation buffer*, foram adicionados 30 μ L de inserto (2,5 ng/ μ L) e 1 μ L do vetor (200 ng/ μ L). A reação foi incubada a 4 °C por 18 horas e purificada conforme kit. A transformação em *E. coli* HB2151 e verificação de eficiência de ligação por PCR foi realizada conforme seção 3.4.7.

3.9 EXPRESSÃO DE VHH E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM COLUNA DE COBALTO

Uma alíquota de 500 μ L de cultura estoque do clone KF498604 (em 2YT amp/glu/glicerol 15 %) foi transferida para 500 mL de meio 2YT/amp/glu 0,1 % e mantida sob agitação (200 rpm) a 37 °C, até densidade óptica de 0,9 no comprimento de onda de 600 nm ($DO_{600} = 0,9$), quando foram adicionados 500 mL de meio 2YT/amp contendo 2mM de IPTG. Após indução por 18 horas sob agitação (150 rpm) a 30 °C, a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 4.980 xg em temperatura ambiente e o pellet ressuscitado em 100 mL de Tris-Base 50mM (pH 8,0). A lise celular foi realizada com adição de 1 mL de lisozima 100 mg/mL (MP biomedical, EUA), mantendo-se sob gelo por 1 hora com eventual homogeneização. O material foi submetido a sonicação (Sonicator S-4000, Misonix, EUA) em 4 ciclos de 30 segundos com amplitude de 40 (potência 20 KHz) e intervalos de 30 segundos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 24.596 xg por 15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 μ m para remoção dos fragmentos celulares (Millex-HV, Millipore, EUA).

Para a purificação foi utilizado sistema de coluna gravitacional (GE Healthcare, EUA). Inicialmente a coluna foi equilibrada com 10 mL tampão de ligação (Fosfato de sódio 50 mM e NaCl 300 mM, pH 7,4). Em seguida, 35 mL da amostra filtrada foram adicionados.

Para a remoção de proteínas não ligadas, 10 mL de tampão de lavagem (Fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 5 mM, pH 7,4) foram adicionados a coluna. Para a eluição foram utilizados 3 mL da solução de Fosfato de sódio 50 mM, NaCl 300 mM e Imidazol 150 mM (pH 7,4). O material foi dialisado contra PBS em colunas *Amicon* 3 kDa (Millipore, EUA) em três ciclos de centrifugação a 5.000 *xg* por 50 minutos a 16 °C. Em seguida foi realizado dosagem por espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm, após interação com corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (BRADFORD, 1976).

3.10 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE VHH EM POLIACRILAMIDA 12,5 %

O clone KF498604 purificado foi submetido a análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). O gel de empacotamento constituía de 333 µL de solução de Acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 (v/v), 625 µL de Tris-HCl 0,5 M (pH 6.8), 25 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10 %, 12,5 µL de persulfato de amônia 2 %, 10 µL de N, N, N', N'-tetra metiletilenodiamina (TEMED) e 1,5 mL de água. O gel de resolução foi preparado com 2,1 mL de solução de acrilamida/bisacrilamida 37,5:1 (v/v), 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 M (pH 8.8), 50 µL de SDS 10 %, 50 µL de persulfato de amônia 2 %, 7,5 µL de TEMED e 1,6 mL de água. A amostra foi diluída 1:1 (v:v) em tampão de amostra contendo agente redutor Dithiothreitol (DTT), submetida a temperatura de 75 °C por 15 minutos e em seguida 15 µL foram aplicados em cada poço do Gel. O tampão de corrida utilizado foi preparado com Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M, SDS 0,1 % (pH 8,3). Como referência de peso molecular foi utilizado o marcador *ColorPlus™ Prestained Protein Marker* 7-175 kDa (*New England Biolabs*, Alemanha). A corrida foi realizada com voltagem fixa (100 v) por 2 horas. O gel foi corado com *Coomassie Blue* (Dinâmica Química Contemporânea, Brasil).

3.11 TESTE DE IMUNORREATIVIDADE CRUZADA

A imunorreatividade cruzada foi realizada com objetivo de verificar a capacidade de interação do clone KF498604 com as toxinas: convulxina, crotamina, giroxina, bothropstoxina I, crotoxina, subunidade CB e crotapotina, também os veneno bruto das serpentes: *B. marajoensis*, *B. jararacussu*, *B. bilineata*, *B. leucurus*, *B. jararaca*, *B. urutu*, *B. diporus*, *B. brasili*, *B. atrox*, *B. moojeni*, *C. atrox*, *C. durissus cumanensis*, *C. durissus collilineatus*, *C. durissus cascavella* e *C. durissus terrificus*. O imunoensaio foi placas do tipo Nunc-MaxiSorp foram adsorvidas com 100 µL da solução de toxinas e venenos em tampão PBS (10 µg/mL) e incubadas por 24 horas a 4 °C. Após lavagem por três vezes com PBST, os sítios remanescentes foram bloqueados com adição de 250 µL de solução de bloqueio por poço e incubação da placa 4 °C por 5 horas. Após nova lavagem com PBST, adicionou-se 100 µL/poço da diluição do nanocorpo KF498604 em solução de bloqueio (10 µg/mL), incubando a 4 °C por 24 horas. O anticorpo de coelho anti-VHH foi diluído 1:12.000 (v/v) em solução de bloqueio e adicionado 100 µL em cada poço, logo após a lavagem da placa com PBST. Incubou-se a placa a 4 °C por 24 horas. Após lavagem com PBST, foram adicionados 100 µL/poço do anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, previamente diluído 1:40.000 (v/v) em solução de bloqueio, mantendo-se incubação por 5 horas. A placa foi novamente lavada com PBST e a revelação realizada com 100 µL/poço de TMB e 100 µL de ácido sulfúrico 0,32 M para o bloqueio da reação, após 30 minutos. A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro. O controle negativo correspondeu a absorbância de poços onde não foi adicionado o nanocorpo, o positivo aqueles que o nanocorpo respondeu a subunidade CB utilizada durante a imunização (amostra padrão). As amostras foram testadas em triplicata. Os dados foram tabulados no programa GraphPad Prism 5 2007® e o “cut- off” foi estabelecido: $[3 \times \text{Desv. pad} + 3 \times \text{Média C-}]$.

4. RESULTADOS

4.1 MONITORAMENTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA APÓS ADMINISTRAÇÃO DE CROTOXINA, CA E CB

Foram realizadas cinco imunizações semanais utilizando crotoxina, CA e CB (seção 3.3) e a resposta imune do *Lama glama* foi avaliada por ELISA utilizando diluição seriada do soro. O título máximo de reatividade do soro ($1:1 \times 10^6$ v/v) foi alcançado no 28º dia de imunização (Figura 11).

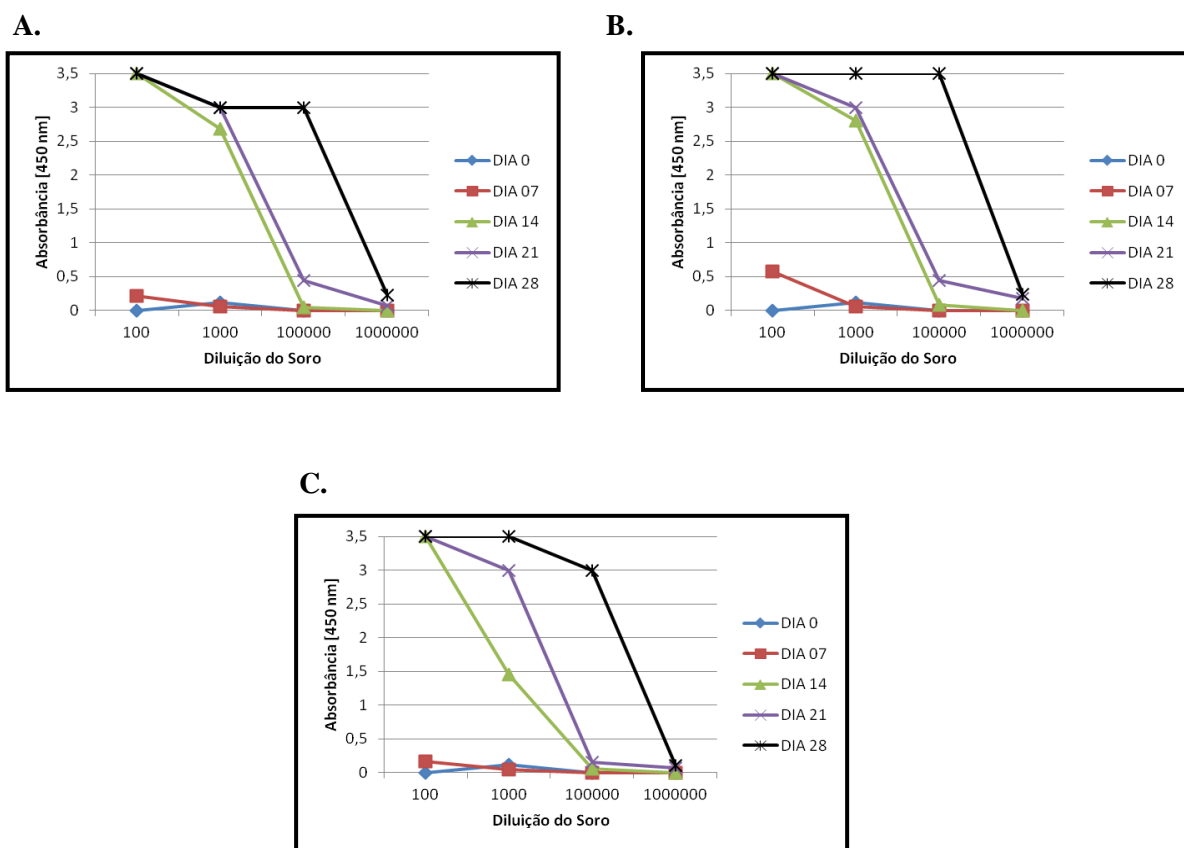


Figura 11: Monitoramento da resposta imunológica do camelídeo após administração de crotoxina, CB e CA. Resultados obtidos em ELISA demonstrando as absorbâncias de diferentes diluições do soro obtido nos seguintes dias de imunização: dia 0 (♦), dia 07 (■), dia 14 (▲), dia 21 (x), e 28 (*). A. Monitoramento realizado para Crotoxina; B. Monitoramento realizado para CB; C. Monitoramento realizado para CA.

4.2 BIBLIOTECA PRIMÁRIA DE VHH

O RNA total obtido de $1,5 \times 10^7$ linfócitos periféricos isolados do animal imunizado foi utilizado para síntese de cDNA. Em seguida, com auxílio de *primers* gene específicos, o material foi submetido a duas reações sequenciais de RT-PCR para amplificação do repertório gênico de VHH. Na PCRI foram obtidas duas bandas, uma de aproximadamente 900 pb correspondente a amplificação das regiões VH-CH1-CH2 do anticorpo convencional (IgG₁), e outra de 600 pb referente aos domínios VHH-CH2 de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos (IgG_{2 e 3}) (Figura 12A). O fragmento de 600 pb foi excisado do gel de agarose, purificado e submetido a PCRII, quando sítios para as endonucleases de restrição *SfiI* e *NotI* foram inseridos, por meio de oligonucleotídeos iniciadores, nas regiões 5' e 3' do repertório de VHH, que corresponde a uma banda de aproximadamente 400 pb (Figura 12B).

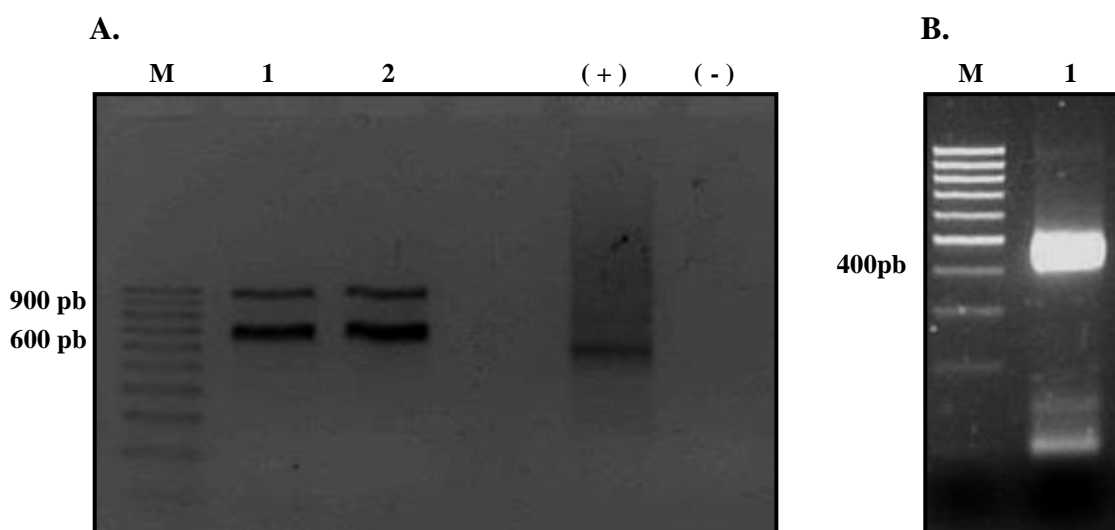


Figura 12: Amplificação do repertório gênico de VHH. A. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % demonstrando produto de RT-PCR proveniente da amplificação gênica de VH-CH1-CH2 correspondente aos anticorpos convencionais (~900 pb) e VHH-CH2 (~600 pb) de imunoglobulinas G_{2 e 3}. M: Peso molecular 100 pares de bases, Produto RT-PCR: 1 e 2, controle positivo: (+) e negativo: (-). B. Amplificação de fragmento de ~ 400 pb após PCR II correspondente ao VHH. M: Peso molecular 100 pares de bases e 1: VHH.

O repertório gênico de VHH amplificado na PCRII foi digerido, recombinado em vetor fagomídeo pHEN1 e transformado em bactéria *E. coli* TG1 por eletroporação, gerando uma biblioteca primária com um título de $3,6 \times 10^{12}$ ufc. A eficiência da transformação foi verificada por PCR de colônias em 10 clones selecionados aleatoriamente. Em 80 % das amostras testadas foram observados fragmentos maiores que 500 pb correspondente ao vetor recombinado com VHH (Figura 13). A divergência entre os tamanhos dos produtos

amplificados revela a diversidade natural do repertório gênico de VHH na biblioteca construída.

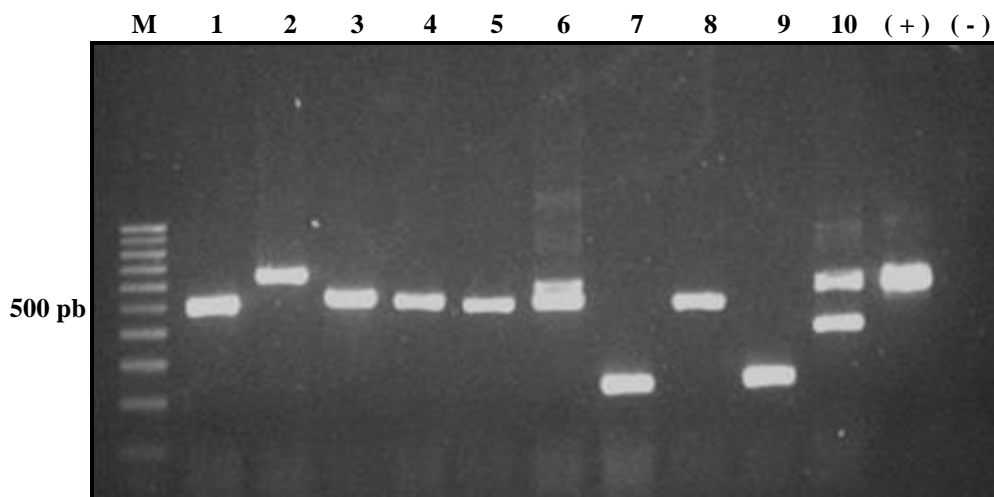


Figura 13: Análise qualitativa da biblioteca primária por PCR de colônia. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % demonstrando produto de PCR de dez colônias aleatórias, após transformação em *E. coli* TG1 do vetor pHEN1 recombinado com VHH. Clones 1-6, 8 e 10 positivos com fragmentos maiores que 500 pb. Clones 7 e 9 não apresentaram inserção do fragmento VHH. Divergências no tamanho dos fragmentos indicam a variabilidade da biblioteca. M: Peso molecular 100 pares de bases, amostras: 1-10, controle positivo: (+) e negativo: (-).

4.3 SELEÇÃO DE CLONES ATIVOS: *PANNING*, ELISA E SEQUENCIAMENTO

Após infecção da biblioteca primária de VHH com o fago auxiliar VCSM13, partículas fágicas recombinantes contendo VHH fusionado a glicoproteína III foram purificadas a partir da cultura celular. A biblioteca secundária apresentou um título de $5,3 \times 10^{11}$ ufc/mL. Três rodadas de *panning* foram realizadas contra crotoxina, CB e CA gerando placas com elevado número de clones. Para a realização dos ELISAs foram utilizados 220 clones aleatórios de placas da seleção contra crotoxina, 220 contra CB e 88 contra CA. Desses, 58 clones reconheceram crotoxina (26 %), 76 a subunidade CB (34 %) e 2 CA (2 %). As absorbâncias dos 20 melhores selecionados para crotoxina e CB estão demonstradas na figura 14. Os clones foram identificados com a inicial “Nb” seguido da sigla da unidade a qual foi selecionado (CB ou CTX) e numeração em placa.

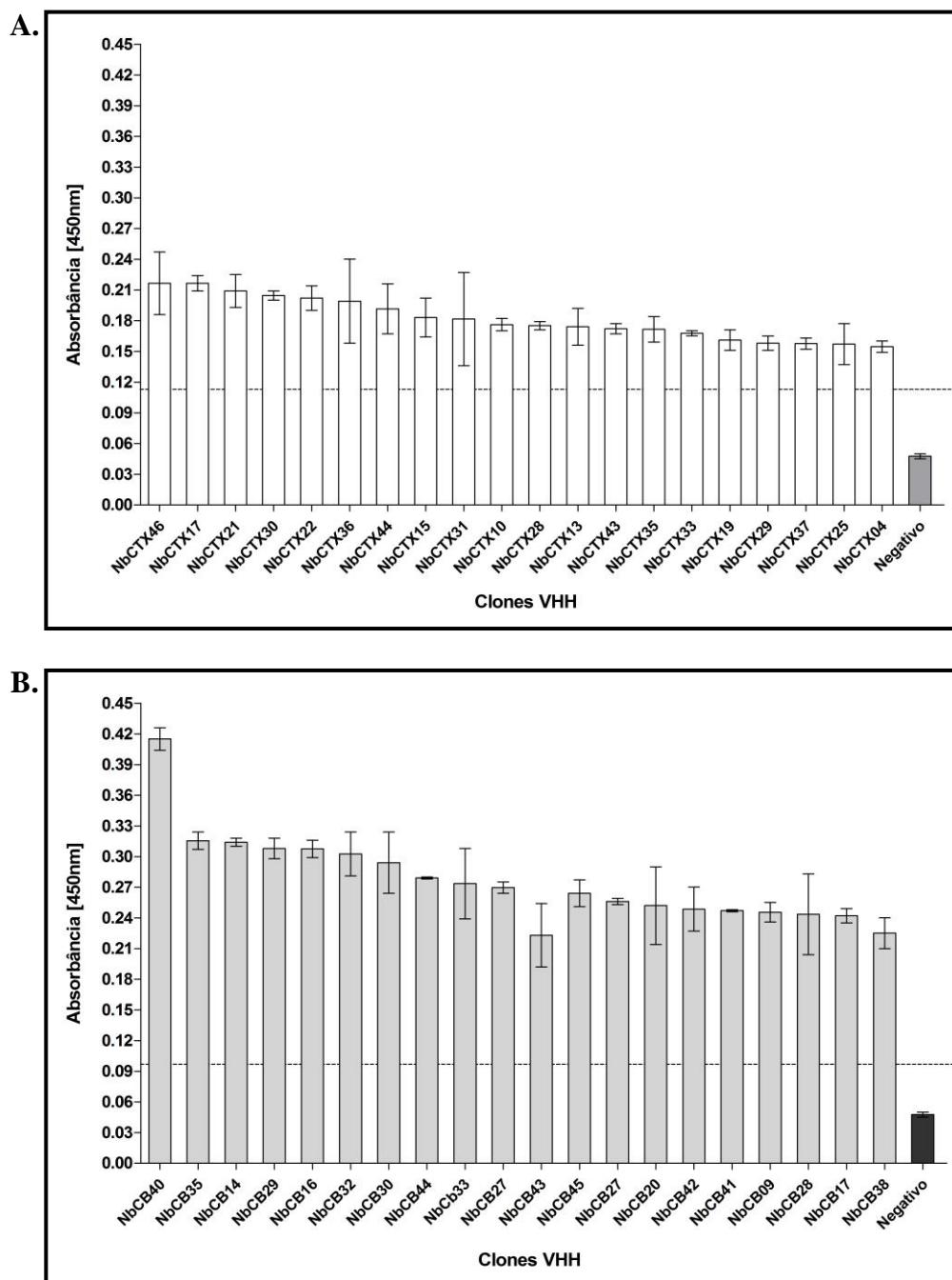
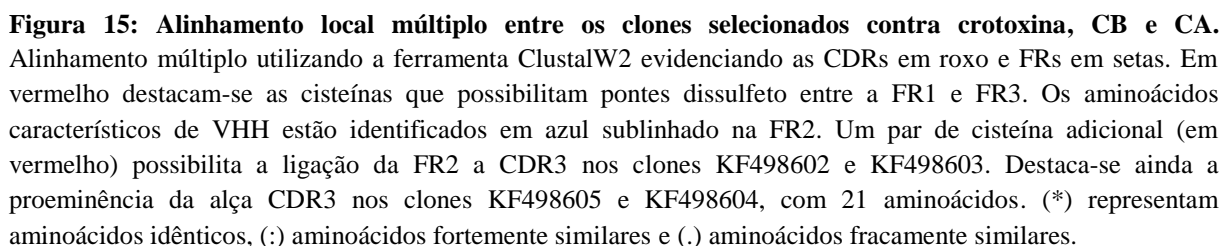


Figura 14: Ensaio imunoenzimático dos clones pós-*panning* contra crotoxina (A.) e CB (B.). Absorbância dos 20 melhores clones em ELISA apresentados em ordem decrescente. As mensurações foram realizadas em duplicata e o *Cut off* representado em linha tracejada foi determinado como: $[3 \times \text{Desv. pad} + 3 \times \text{Média C-}]$. O controle negativo correspondeu a absorbância dos poços onde não foi adsorvido proteína.

Dez clones selecionados de diferentes rodadas de *panning* foram sequenciados e submetidos ao alinhamento múltiplo, utilizando a ferramenta ClustalW2. Com base na similaridade das sequências foram identificados cinco perfis distintos de nanocorpos: NbCB42, NbCB16, NbCTX17, NbCTX21 e NbCA12, os quais foram depositados no



4.4 EXPRESSÃO DE NANOCORPOS: SUBCLONAGEM EM pHEN1-6HIS, TRANSFORMAÇÃO EM *E. coli* HB2151 E PURIFICAÇÃO.

Após análise *in silico*, os clones selecionados foram digeridos, recombinados em vetor pHEN1-6HIS e transformados em bactéria não supressora de *stop codon* *E. coli* HB2151, possibilitando a expressão de VHH livre da glicoproteína III fágica, e sua purificação por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto. A eficiência da transformação do vetor recombinante em *E. coli* HB2151 foi verificada por PCR de colônias isoladas em placa de cultura de cada clone. O produto da amplificação foi evidenciado por eletroforese em gel de agarose 1,5 %, conforme Figura 16.

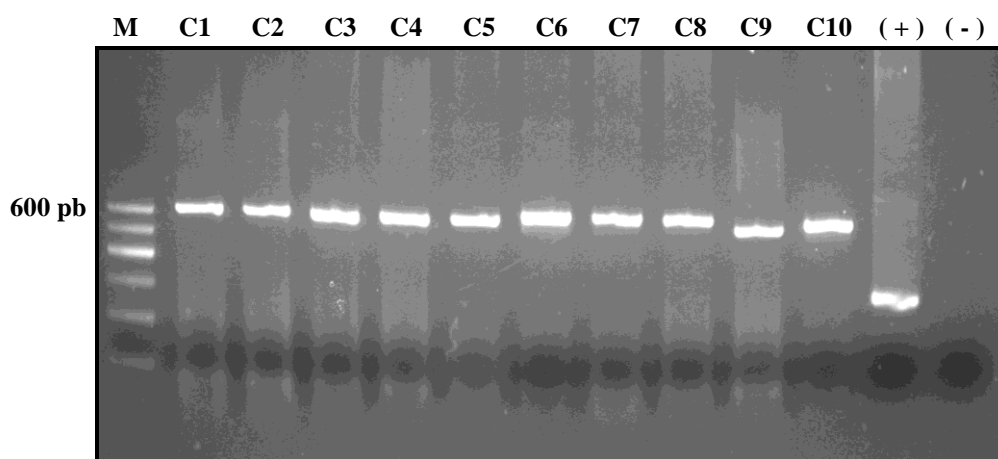


Figura 16: Amplificação do VHH-pHEN1-6HIS após transformação em *E. coli* HB2151. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % demonstrando produto de PCR de dez colônias aleatórias após transformação em *E. coli* HB2151 do vetor pHEN1-6HIS recombinado com VHH. Amostras 1-10 positivas com fragmentos maiores próximos a 600pb. O controle positivo corresponde a amplificação de parte do vetor vazio (~ 200 pb). Marcador de Peso molecular de 100 pb (M), Clones KF498605, KF498604, KF498602, KF498603 e KF498606 (C1-C10) em duplicata, respectivamente, controle positivo (+) e controle negativo (-).

Dentre os clones sequenciados e subclonados, o KF498604 (NbCB16) por possuir maior alça CDR3 e todas as marcações previstas para VHH de camélídeo, foi selecionado para as etapas de expressão e purificação por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto. Utilizando colunas gravitacionais *HisGraviTrap TALON* foi possível a purificação de 1,5 mg de VHH por litro de cultura bacteriana induzida. A análise do purificado foi realizada por eletroforese em gel poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) na qual se verificou a presença de banda de aproximadamente 17 kDa correspondente ao nanocorpo KF498604 com a calda de histidina e *Mic tag*, conforme previsto em análise da sequência proteica na programa Editseq

7.1.0 (Dnastar). O aparecimento de bandas abaixo de 46 e acima de 58 kDa sugere a formação de dímeros e tetrameros, respectivamente (Figura 17).

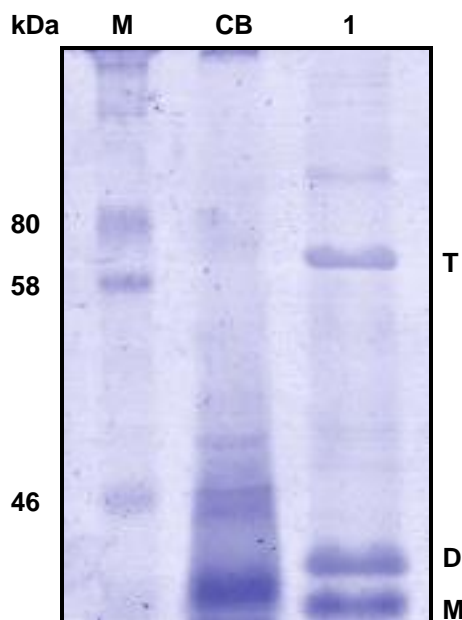


Figura 17: Análise eletroforética do clone KF498604 expresso em *E. coli* HB2151 e purificado em coluna de afinidade a cobalto. SDS-PAGE 12,5 % demonstrando perfil de bandas próximas de 17, 34 e 68 kDa, sugerindo estrutura proteica monomérica (M), dimérica (D) e tetramérica (T), respectivamente. Marcador de peso molecular 7- 175 kDa (M), subunidade CB, clone KF498604 (1).

4.5 AVALIAÇÃO DE IMUNORREATIVIDADE CRUZADA

A imunoreatividade cruzada foi avaliada submetendo o clone KF498604 purificado a ELISA em placas adsorvidas com diferentes venenos e toxinas (10 µg/mL). A Figura 18 apresenta as absorbâncias obtidas na interação do nanocorpo na razão 1:1 com venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, como também toxinas purificadas. As amostras positivas estão em destaque (cor verde). Observa-se a especificidade do clone para o veneno de subespécies de *Crotalus durissus* e o reconhecimento da subunidade CB livre e conjugada no heterodímero crotoxina.

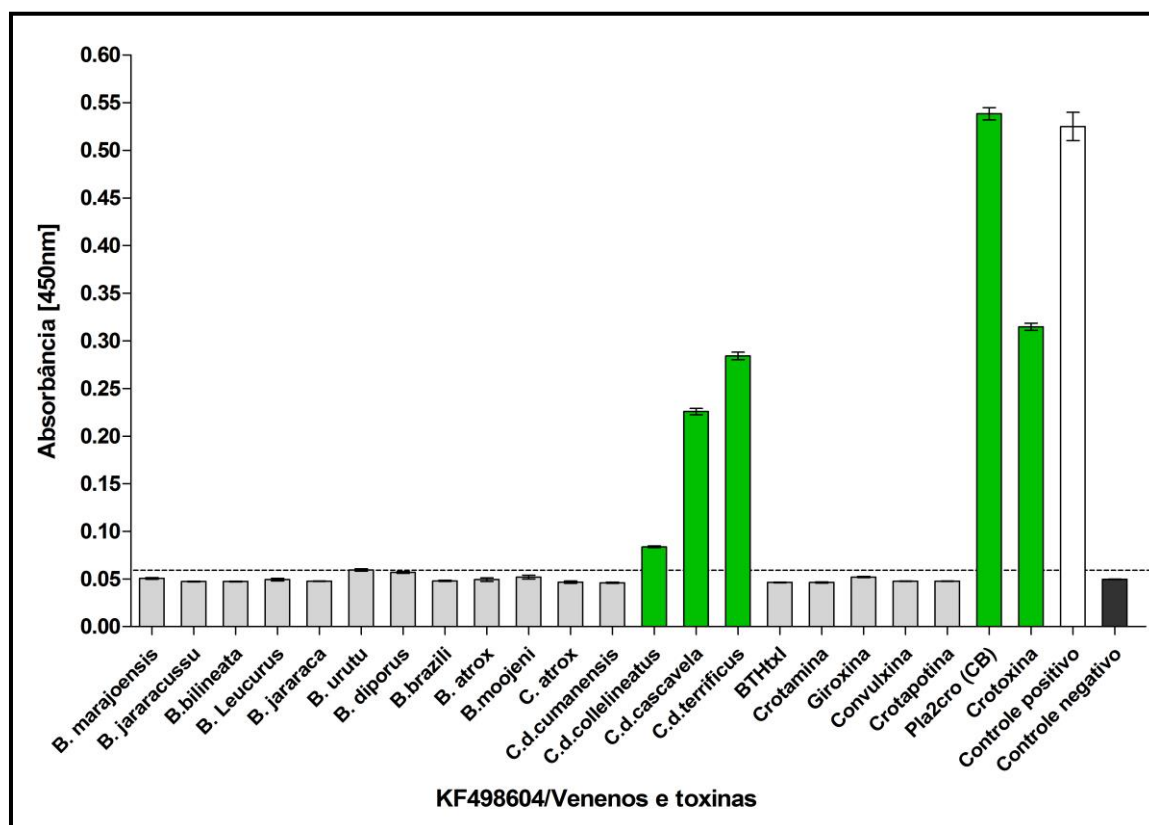


Figura 18: Avaliação da imunoreatividade do clone KF498604 com diferentes venenos e toxinas. Absorbâncias obtidas em ELISA realizado em placa sensibilizada com 10 µg/mL de veneno de *Bothrops*, *Crotalus* e toxinas purificadas utilizando razão 1:1 do nanocorpo. Em verde destaca-se as amostras positivas acima da média do *cut off* representado em linha tracejada. Observa-se especificidade do nanocorpo a constituinte do veneno de serpentes subespécies de *Crotalus durissus* e a interação com a subunidade CB livre e conjugada em crotoxina.

5. DISCUSSÃO

A busca por alternativas complementares à soroterapia convencional é decorrente da necessidade de melhora na eficiência terapêutica relacionada a neutralização de toxinas em tecidos profundos, de redução dos efeitos adversos devido a administração de imunoglobulinas não humanas, bem como ao aumento da produção e da qualidade dos soroterápicos, utilizando métodos mais eficientes e controlados (BROWN, 2012; GUTIÉRREZ; LEON; LOMONTE, 2003; WARRELL, 2012).

Os nanocorpos, devido ao reduzido tamanho (~15kDa), elevada solubilidade, permeabilidade tecidual, estabilidade a alterações de pH e temperatura, possibilidade de interação com sítios inacessíveis ao anticorpo convencional, baixa imunogenicidade e a capacidade de produção em microrganismos, são promissores para diferentes aplicações

terapêuticas, inclusive na soroterapia antiofídica (CORTEZ-RETAMOZO, 2002; DUMOULIN et al., 2002; ESPINO-SOLIS et al., 2009; HARMSSEN; HAARD, 2007; MUYLDERMANS, 2013; STEWART; MACKENZIE; HALL, 2007; VINCKE; MUYLDERMANS, 2012).

Esses fragmentos foram capazes de prevenir em 100 % a morte de camundongos induzida pela ação da neurotoxina AahI (9.852 Da) do escorpião *Androctonus australis Hector*, após administração intracerebroventricular de solução previamente incubada com nanocorpo (HMILA et al., 2008). A letalidade da neurotoxina α -cobratoxina (7.820 Da) da serpente *Naja kaouthia* em camundongos foi totalmente prevenida pela administração intraperitoneal da solução contendo razão molar de 0,75:1 de VHH e dose letal 100 (DL 100) da toxina (RICHARD et al., 2013). Três vezes a dose letal 50 (DL50) da neurotoxina botulínica E (BoNT/E) em camundongos foi neutralizada após a administração intraperitoneal de 150 ng/Kg de VHH (BAKHERAD et al., 2013). Com base no potencial terapêutico desses fragmentos, este trabalho propôs a seleção e caracterização parcial de nanocorpos ativos contra crotoxina, a neurotoxina de *Crotalus durrisus terrificus*.

A biblioteca de nanocorpos pode ser construída a partir do repertório gênico de doador imunizado (tipo imune) ou não imunizado (tipo *naive*), como também pode ter origem semi-sintética na qual a diversidade de fragmentos é gerada por técnicas moleculares promovendo a modificação randômica das CDR's (HOOGENBOOM, 2005). As bibliotecas do tipo imunes exploram a especificidade e afinidade desenvolvida naturalmente após imunização, gerando assim clones com maior potencial de interação com alvo, como observado por Richard e colaboradores (2013) comparando nanocorpos contra α -cobratoxina, onde se verificou maior afinidade daqueles selecionados por bibliotecas imunes (KD entre 0,4 – 24 nM), do que os de biblioteca *naive* (KD entre 2 – 3 μ M). Buscando garantir uma alta afinidade e especificidade de nanocorpos contra crotoxina e suas frações, o repertório gênico de VHH foi amplificado a partir do cDNA obtido de RNA de linfócitos de *Lama glama* previamente imunizado, para a construção da biblioteca. Para garantir a variabilidade da biblioteca imune, os linfócitos foram coletados quando o título de anticorpos responsivos às três frações atingiu $1:1 \times 10^6$ (v/v) em ELISA.

A tecnologia *phage display*, utilizada inicialmente para a seleção de peptídeos a partir da fusão com proteínas de capsídeo de fagos filamentosos, tem se mostrado eficiente para a seleção de pequenos fragmentos de anticorpos. O sucesso da técnica depende

principalmente do número de clones individuais da biblioteca primária, pois quanto maior o número de sequências diferentes, maior a probabilidade de captura de ligantes ativos, como também da qualidade no processo de seleção (NOREN; J. NOREN, 2001). Assim, objetivando a construção da biblioteca primária com um número satisfatório de clones, o vetor pHEN1 foi utilizado (Figura 10), já que fagomídeos geram bibliotecas com número de clones maior que aquelas construídas com fagos vetores, além da expressão monovalente facilitando a determinação da constante de afinidade entre anticorpo-ligante (HOOGENBOOM, 1991; BRADBURY; MARKS, 2004).

O título da biblioteca primária de VHH em *E. coli* TG1 foi satisfatório, quando comparado com as desenvolvidas por Ghahroudi e colaboradores (1997) 10^7 clones individuais, Hmila e colaboradores (2008) 5×10^6 , Bakherad e colaboradores (2013) $3,2 \times 10^7$, Richard e colaboradores (2013) $5,0 \times 10^6$.

A presença de um *amber stop codon* (TAG) entre a região de inserção do inserto e o *Fd-gene III*, possibilitou a expressão de VHH conjugado a glicoproteína III em cepa supressora *E. coli* TG1 (supE), pela adição do aminoácido glutamina (LOWMAN; DENNIS, 2004). O fago auxiliar VCSM13 foi utilizado para o processo de construção da biblioteca secundária. Como o pHEN1 não possui todo o repertório gênico para a construção de uma partícula fágica, a infecção da biblioteca primária com o fago auxiliar possibilita a expressão das demais proteínas que constituem o capsídeo do bacteriófago (pVI, pVIII, pVII, pIX). Uma mutação na origem de replicação do VCSM13 diminui a capacidade replicativa do genoma fágico, permitindo que durante a montagem de novas partículas virais o bacteriófago formado carregue preferencialmente o pHEN1 como material genético, garantindo assim uma conexão entre o fenótipo da proteína recombinante apresentada e o seu genótipo (RUSSEL; LOWMAN; CLACKSON, 2004). O título da biblioteca de fagos recombinantes contendo VHH fusionado a glicoproteína III foi de $5,3 \times 10^{11}$ ufc/mL, permitindo a realização das etapas de seleção (BRADBURY; MARKS, 2004).

Apenas dois clones VHH de 88 testados foram reativos em ELISA contra a subunidade CA. Em análise *in silico* foi verificado que se tratavam de um único clone (NbCA12) com uma CDR3 incomum, constituída de apenas cinco aminoácidos. Possivelmente, a baixa eficiência na seleção de nanocorpos contra CA ocorreu devido não toxicidade desta subunidade, ou por não possuir atividade enzimática, e, sobretudo por sua elevada capacidade imunorregulatória (SAMPAIO et al., 2011). *In vivo* foi demonstrado que

CA apresenta atividade anti-inflamatória sendo capaz de reduzir o edema de pata ocasionado pela administração de carragenina em ratos (LANDUCCI et al., 1995). *In vitro* a proliferação de linfócitos estimulados com concanavalina A é inibida na presença desta subunidade, enquanto que a produção de PGE₂ por Macrófago é aumentada, o que possivelmente contribui para este efeito inibitório (GARCIA et al., 2003).

Foram testados em ELISA 220 clones selecionados em três rodadas de *panning* contra a subunidade CB e 220 contra crotoxina, obtendo-se 76 e 58 clones reativos, respectivamente. Quatro clones de cada foram sequenciados e dois perfis distintos de nanocorpos contra CB (KF498604, KF498605) e dois contra crotoxina (KF498602 e KF498603) foram observados. Todos esses clones apresentaram substituições de aminoácidos na região FR2, característica de VHH (Y/F37), (E,G,Q44), (R45) e (L/F47), enquanto que o nanocorpo selecionado contra CA (KF498606) possui apenas modificações nos resíduos na posição 37 e 45 (Figura 15). Essas substituições são características de VHH de camelídeos e são responsáveis pela elevada hidrofiliabilidade e capacidade de remodelamento após exposição a temperaturas desnaturantes (60-80 °C), conferindo vantagens em relação a outros fragmentos de anticorpos como scFv ou dsFv (DUMOULIN et al., 2002; GHAIROUDI et al., 1997; KOLKMAN; LAW, 2010).

Todos os clones com exceção do KF498606 apresentaram CDR3 maior que a do VH humano (~14 aminoácidos), em especial o KF498605 e KF498604 com 21 resíduos cada. As regiões CDRs 1 e 3 do VHH são normalmente maiores para fornecer uma superfície de interação antigênica compensatória a ausência do domínio VL em anticorpos de cadeia pesada de camelídeos (VU et al., 1997; MUYLDERMANS, 2013). Além disso, os domínios CDR1 e 2 de VHH são muito mais flexíveis que do VH humano e a CDR3 mais proeminente são capazes de alcançar sítios enzimáticos inacessíveis ao anticorpo convencional (HARMSSEN; HAARD, 2007; KOLKMAN; LAW, 2010).

As regiões FR1 e FR3 dos clones selecionados podem formar ponte dissulfeto devido à presença de aminoácido cisteína. Os clones KF498602 e KF498603 possuem ainda um par extra desse aminoácido que possibilita a interação entre a FR2 com a CDR3. Essa ponte dissulfeto extra é mais frequente em VHHs provenientes de camelos e dromedários, do que em llamas. Sua presença confere maior rigidez a alça CDR3 dos nanocorpos selecionados impedindo modificações conformacionais e aumentando a estabilidade desses fragmentos (KOLKMAN; LAW, 2010; MUYLDERMANS, 2013).

O nanocorpo KF498604 foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto após ser recombinado em vetor com calda de histidina (pHEN1-6HIS), transformado em bactéria não supressora de *stop codon* HB2151 e expresso na forma solúvel. O perfil eletroforético em SDS-PAGE evidenciou a presença de formas monoméricas, diméricas e tetraméricas, semelhante ao descrito por Olichon e colaboradores (2007) com nanocorpos em solução com baixa concentração de NaCl.

O teste de imunorreatividade em ELISA revelou que o clone KF498604 reconhece a subunidade CB tanto na forma livre quanto conjugada no heterodímero crotoxina, não interagindo com outras toxinas (giroxina, convulxina, crotamina) predominantes no veneno de *Crotalus durissus terrificus* (GEORGIEVA et al., 2009). Dessa forma, é possível sugerir que a fração responsável pelo reconhecimento do veneno desta serpente no ELISA é a subunidade CB. A quantidade de crotoxina no veneno bruto de *C. durissus cascavella*, *C. durissus collilineatus* e *C. durissus cumanensis* é de 72,0 %, 67,4 % e 2,6 %, respectivamente (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010; CALVETE et al., 2010), o que justifica os perfis diferenciados de absorbância, sobretudo o valor abaixo do *cut off* obtido no teste com o veneno de *C. durissus cumanensis*.

6. CONCLUSÃO

- O desenvolvimento desse trabalho resultou na construção de biblioteca recombinante de VHH em *E. coli* cepa TG1 com título de $3,6 \times 10^{12}$ ufc, a partir do repertório gênico obtido de linfócitos de *Lama glama* imunizado;
- Em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA foram identificados 58 clones VHH ativos contra crotoxina, 76 contra CB e 2 contra CA;
- Cinco perfis de VHH foram identificados e depositados no banco de dados *GenBank* com os números de acesso: KF498605, KF498604, KF498602, KF498603 e KF498606;
- As marcações na região *framework 2* características de VHH, cisteínas e regiões determinantes de complementariedade, foram identificadas nos clones sequenciados;
- O clone KF498604 foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto e em ELISA recolheu a subunidade CB purificada, no heterodímero crotoxina e em bruto de *C. durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* e *C. durissus collilineatus*.

Avaliando os desafios encontrados na soroterapia convencional, as características biológicas únicas dos nanocorpos e os resultados satisfatórios de seleção e caracterização de clones ativos contra crotoxina e subunidades, consideramos promissores o desenvolvimento de novas ferramentas que auxiliem o tratamento atual, baseado em fragmentos de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos, engenheirados pela tecnologia do DNA recombinante. Entretanto, a capacidade de neutralização dos clones VHH selecionados deve ser avaliada, em especial o KF498604, em ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizando crotoxina e veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, G. et al. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v.26, p.953-960, 1988.
- AMARAL, C. F. S. et al. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.28, p.220-227, 1986.
- AMARAL, C. F. S.; MAGALHÃES, R. A.; REZENDE, N. A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.33, p.251-255, 1991.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M. et al. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v.23, p.631-636, 1985.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: Cardoso J. L. C. et al. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, p.91-97, 2003.
- BAKHERAD, H. et al. In vivo neutralization of botulinum neurotoxins serotype E with heavy-chain camelid antibodies (VHH). **Molecular Biotechnology**, v.55, p.159-6, 2013.
- BERNARDE, P. S. Acidentes ofídicos. **Universidade Federal do Acre**. 2009. Disponível em: <<http://www.herpetofauna.com.br/OfidismoBernarde.pdf>>. Acesso em 06 de Dez 2013.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.2. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em 02 de Out 2013.
- BHAUMIK, S. Snakebite: a forgotten problem. **British Medical Journal**, v.346, p.628-630, 2013.
- BLANC, M. R. et al. A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type γ -globulins from camelid sera. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.54, p.207-212, 2009.
- BOCHNER, R. **Acidentes por animais peçonhentos: aspectos históricos, epidemiológicos, ambientais e sócio-econômicos**. 2003. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Rio de Janeiro – Brasil, 2003.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p.7-16, 2003.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v.73, p.1758-1776, 2010.

BON, C. et al. Postsynaptic Effects of Crotoxin and of Its Isolated Subunits. **European Journal of Biochemistry**, v.99, p.471-481, 1979.

BOUCHIER, C. et al. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1088, p.401-408, 1991.

BRADBURY, M. A.; MARKS, J. D. Phage antibody libraries. In: Clackson, T.; Lowman, H.B. Phage Display. New York: **Oxford University Press**, p. 243-288, 2004.

BRADFORD, M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2º edição. Brasília – DF, 2001. Disponível em: <http://ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/manu_peco01.pdf%E2%80%8E>. Acesso em 12 de Nov 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica. Caderno 14**. Acidentes por Animais Peçonhentos. 7º edição. Brasília – DF, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf>. Acesso em: 06 Dez 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Acidentes por Animais Peçonhentos. **Situação Epidemiológica**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarTexto&codConteudo=5817&codModuloArea=783&chamada=acidentes-por-serpentes>>. Acesso em 06 Dez 2013.

BRASIL. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. **Soroterapia Antivenenos**. Curitiba-PR, 2013. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonosesintoxicacoes/Soroterapia_Antivenenos.pdf>. Acesso em 06 de Nov 2013.

BRAZIL, O. V. Prefácio. In: Cardoso J. L. C. et al. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, 2003.

BRAZIL, O. V.; EXCELL, B. J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **Journal of Physiology**, v.212, p.34-35, 1971.

BRAZIL, O. V.; FONTANA, M. D.; HELUANY, N. F. Nature of the postsynaptic action of crotoxin at guinea-pig diaphragm end-plates. **Journal of Natural Toxins**, v.9, p.33-42, 2000.

BROWN, N. Consequences of neglect: analysis of the sub-saharan african snake antivenom market and the global context. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, p.1670-1677, 2012.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive

paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **Journal of Proteomics Research**, v.9, p. 528–544, 2010.

CHANG, C. C.; LEE, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like-bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.296, p.159-168, 1977.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, Antivenoms And Immunotherapy. **Toxicon**, v.36, p.823-846, 1998.

CONRATH, K. E. et al. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. **Developmental and Comparative Immunology**, v.27, p.87-103, 2003.

CORTEZ-RETAMOZO, V. et al. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. **International Journal of Cancer**, v.98, p.456-462, 2002.

DENNIS, M. S.; LOWMAN, H. B. Phage selection strategies for improved affinity and specificity of proteins and peptides antibody libraries. In: Clackson, T.; Lowman, H.B. Phage Display. New York: **Oxford University Press**, p. 61-83, 2004.

DIAS, L. A. et al. Imagem da Semana – Caso Clínico 33. **Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais**. Disponível em: < <http://www.medicina.ufmg.br/imagemdasemana/index.php?caso=33>>. Acesso em 02 de Out 2013.

DUMOULIN, M. et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. **Protein Science**, v.11, p.500-515, 2002.

ESPINO-SOLIS, G. P. et al. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. **Journal of Proteomics**, v.72, p.183-199, 2009.

FAURE, G. et al . Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, v.30, p.8074-8083, 1991.

FAURE, G. et al. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. **European Journal of Biochemistry**, v.214, p.491-496, 1993.

FAURE, G. et al. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **European Journal of Biochemistry**, v.223, p.161-164, 1994.

FAURE, G. et al. Crotoxin acceptor protein isolated from *Torpedo* electric organ: binding properties to crotoxin by surface plasmon resonance. **Toxicon**, v.41, p.509-551, 2003.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.25, p.229-234, 1987.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F.A. Crystal structure of Crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v.412, p.176-191, 2011.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 60, p. 64-73, 1956.

GARCIA, F. et al. Crota-potin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE₂ synthesis. **Toxicon**, v.42, p.433-437, 2003.

GEORGIEVA, D. et al. Snake Venomic of *Crotalus durissus terrificus* correlation with pharmacological activities. **Journal of Proteome Research**, v.9, p.2302-2316, 2009.

GHAHROUDI, M. A. et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. **FEBS Letters**, v.414, p.521-526, 1997.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, v.22, p.85-98, 1984.

GUIDOLIN, F. R. et al. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**, v.66, p.7-17, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. **Toxicon**, v.60, p. 676-687, 2012.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEON, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clinical Pharmacokinetics**, v.42, p.721-741, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v.82, p.841-850, 2000.

HAMERS-CASTERMAN, C. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Letters to Nature**, v.363, p.446-448, 1993.

HARMSSEN, M. M.; DE HAARD, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.77, p.13-22, 2007.

HAWGOOD, B. J.; SMITH, J. W. The mode of action at the mouse neuromuscular junction of the phospholipase A-crota-potin complex isolated from venom of the South American rattlesnake. **British Journal of Pharmacology**, v.61, p.597-606, 1977.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT H. Biological roles of the two components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.68, p.1560-1563, 1971.

HMILA, I. et al. VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI. **Molecular Immunology**, v.45, p.3847-3856, 2008.

HOOGENBOOM, H. R. et al. Multi-subunit protein on the surface of filamentous phage: Methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.4133-4137, 1991.

HOOGENBOOM, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. **Nature Biotechnology**, v.23, p.1105-1116, 2005.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. The epidemiology and clinical picture of an accidental bite by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.34, p.347-354, 1992.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v.5, p.1591-1604, 2008.

KERKIS, I. et al. Biological versatility of crotoamine - a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. **Expert opinion on Investigational Drugs**, v.19, p.1515-1525, 2010.

KOLKMAN, J. A.; LAW, D. A. Nanobodies - from llamas to therapeutic proteins. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.7, p.139-146, 2010.

KRIZÁJ, I.; GUBENSEK, F. Neuronal receptors for phospholipases A₂ and beta-neurotoxicity. **Biochimie**, v.82, p.807-814, 2000.

KUBY, J. et al. Antigens and Antibodies. In: **Kuby Immunology 6^{ed}**. W. H. Freeman, p. 76-110, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LANDUCCI, E.C.T. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotoapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **British Journal of Pharmacology**, v.114, p. 578-583, 1995.

MARCHI-SALVADOR, D. P. et al. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A₂ formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, v.72, p.883-891, 2008.

MARTINS, A. M. C. et al. Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v.36, p.1441-1450, 1998.

MARTINS, A. M. C. et al. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v. 40, p.1165-1171, 2002.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso J. L. C. et al. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, p.33-62, 2003.

MUYLDERMANS, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. **Annual Review of Biochemistry**, v.82, p.775-797, 2013.

MUYLDERMANS, S.; CAMBILLAU, C.; WYNS, L. Recognition of antigens by single domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v.26, p.230-235, 2001.

NGUYEN, V. K.; DESMYTER, A.; MUYLDERMANS, S. Functional Heavy-Chain Antibodies in Camelidae. **Advances In Immunology**, v. 79, p.261-296, 2001.

NGUYEN, V. K.; MUYLDERMANS, S.; HAMERS, R. The Specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. **Journal Molecular Biology**, v. 275, p. 413-418, 1998.

NOREN, K. A.; NOREN, C. J. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. **Methods**, v.23, p. 169-178, 2001.

OLICHON, A. et al. Heating as a rapid purification method for recovering correctly-folded thermotolerant VH and VHH domains. **BMC Biotechnology**, v.7, p.1-8, 2007.

OWNBY C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **Toxicon**, v.17, p.213-238, 1998.

PADRO-FRANCESCHI, J.; BRAZIL, O.V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American Rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.19, p. 975-887, 1981.

PANDE, J.; SZEWCZYK M. M.; GROVER A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, v.28, p.849-858, 2010.

PASSERO, L. F. D. et al. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. Venoms. **Journal of Parasitology Research**, v. 101, p. 1365-1371, 2007.

POLGÁR, J. et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a c-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.13576-13583, 1997.

RICHARD, G. **Isolation And Characterization of High Affinity VHH Antibody Fragments Against Alpha-Cobratoin**. 2009. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - The Faculty of Graduate Studies, The University of Guelph, 2009. Disponível em: <<http://jchhall.files.wordpress.com/2011/03/gabrielle-richard-final-thesis-16dec09.pdf>>. Acesso em 06 de Nov 2013.

RICHARD, G. et al. In vivo neutralization of a-cobratoin with high-affinity Llama single domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody. **PLoS ONE**, v.8, p.6949, 2013.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; HAWGOOD, B. J.; SMITH, I. C. H. Properties of the early phases of Crotoxin poisoning at frog neuromuscular junctions. **Toxicon**, v.28, p.1479-1489, 1990.

RUSSEL, M.; LOWMAN, H. B.; CLACKSON, T. Introduction to phage biology and phage display. In: Clackson, T.; Lowman, H.B. Phage Display. New York: **Oxford University Press**, p. 1-26, 2004.

SALVINI, T. F. et al. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v.39, p.1141-1149, 2001.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v.55, p.1045-1060, 2010.

SEWALL, H. **The Journal of Physiology**, v.8, p.203-210, 1887.

SLOTA K.H.; FRAENKEL-CONRAT. Two Active Proteins from Rattlesnake Venom. **Nature**, n.3587, p.213, 1938.

STÁBELI, R. G. et al. Purification of Phospholipases A₂ from american snake venoms. In: **Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis**. InTech, p. 3-34, 2012.

STEWART, C. S.; MACKENZIE, C. R.; HALL, J. C. Isolation, characterization and pentamerization of a-cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naive phage display library: Preliminary findings for antivenom development. **Toxicon**, v.49, p.699-709, 2007.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v.41, p.541-557, 2003.

VELARDE, D.T. Antivenom production: routine/development. **Toxicon**, v.38, p.487-595, 2000.

VINCKE, C.; MUYLDERMANS, S. Introduction to heavy chain antibodies and derived nanobodies. In: Saerens, D.; Muyldermans S. Methods in Molecular Biology. **Springer Science**, v. 911, p.15-26, 2012.

VU, K.B. et al. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. **Molecular Immunology**, v.34, p.1121-1131, 1997.

WARRELL, D. A. Guidelines for the management of snake-bites. **WHO Library Cataloguing**, New Delhi, 2010.

WARRELL, D. A. Venomous Bites, Stings, and Poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.26, p.207-223, 2012.

WEN, F. H. Soroterapia. In: Cardoso J. L. C. et al. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, p.380-393, 2003.

ANEXOS

SEQUÊNCIAS DE VHH DEPOSITADAS NO GENBANK

LOCUS **KF498602** 387 bp mRNA linear MAM 20-NOV-2013
 DEFINITION Lama glama clone 17 immunoglobulin heavy chain variable region mRNA, partial cds.
 ACCESSION KF498602
 VERSION KF498602.1 GI:558064657
 KEYWORDS .
 SOURCE Lama glama (llama)
 ORGANISM Lama glama
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda; Camelidae; Lama.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 387)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G., Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Selection of VHH antibody fragments against crotoxin, a neurotoxin from Crotalus d. terrificus
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 387)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G., Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-AUG-2013) Laboratorio de Engenharia de Anticorpos, Fundacao Oswaldo Cruz Rondonia, Rua da Beira 7671, Porto Velho, Rondonia 76812-245, Brazil
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..387
 /organism="Lama glama"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9844"
 /clone="17"
 /cell_type="peripheral blood lymphocyte"
 CDS <1..>387
 /note="IgGVH"
 /codon_start=1
 /product="immunoglobulin heavy chain variable region"
 /protein_id="AHA50072.1"
 /db_xref="GI:558064658"
 /translation="MAEVQLQASGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTLNHYAIGWFRQAPG KEREVSCISSSDVSAYYTDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATEL ISSCASTWYDAYSYWGQGTQVTVTVSS"
 ORIGIN
 1 atggccgagg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg cgcagcctgg ggggtctctg
 61 agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttgaatcatt atgccatagg ctggttccgc
 121 caggccccag ggaaggagcg cgaggggggc tcatgtatta gtagtagtga tgtcagcgca
 181 tactatacag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caagaacacg
 241 gtgtatctgc aaatgaacag cctgaaacct gaggacacg ccgtttatta ctgtgcgaca
 301 gagctgatct ctagttgtgc tagtacctgg tacgatgcgt atagctattg gggccagggg
 361 acccaggtca ccgtcaccgt ctctcta

LOCUS **KF498603** 378 bp mRNA linear MAM 20-NOV-2013
 DEFINITION Lama glama clone 21 immunoglobulin heavy chain variable region
 mRNA, partial cds.
 ACCESSION KF498603
 VERSION KF498603.1 GI:558064664
 KEYWORDS .
 SOURCE Lama glama (llama)
 ORGANISM Lama glama
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
 Camelidae; Lama.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 378)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.,
 Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Selection of VHH antibody fragments against crotoxin, a neurotoxin
 of Crotalus d. terrificus
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 378)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.,
 Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-AUG-2013) Laboratorio de Engenharia de Anticorpos,
 Fundacao Oswaldo Cruz Rondonia, Rua da Beira 7671, Porto Velho,
 Rondonia 76812-245, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..378
 /organism="Lama glama"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9844"
 /clone="21"
 /cell_type="peripheral blood lymphocyte"
CDS <1..>378
 /note="IgGVH"
 /codon_start=1
 /product="immunoglobulin heavy chain variable region"
 /protein_id="AHA50073.1"
 /db_xref="GI:558064665"
 /translation="MAEVQLQASGGGLAQPGGSLRLSCAASGFTLNHYAIGWFRQAPG
 KREGVSCISSSDVSAYYTDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATEL
 ISSCASTWYDAYSYWGQGTVTVSS"
 ORIGIN
 1 atggccgagg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg cgcagcctgg ggggtctctg
 61 agactctcct gtgcagcctc tggattcact ttgaatcatt atgccatagg ctggttccgc
 121 caggccccag ggaaggagcg cgaggggggtc tcatgtatta gtagtagtga tgtcagcgca
 181 tactatacag actccgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caagaacacg
 241 gtgtatctgc aaatgaacag cctgaaacct gaggacacgg ccgtttatta ctgtgcgaca
 301 gagctgatct ctagttgtgc tagtacctgg tacgatgcgt atagctattg gggccagggc
 361 accgtcaccg tctcctcc

LOCUS **KF498604** 396 bp mRNA linear MAM 20-NOV-2013
 DEFINITION Lama glama clone 16 immunoglobulin heavy chain variable region
 mRNA, partial cds.
 ACCESSION KF498604
 VERSION KF498604.1 GI:558064671
 KEYWORDS .
 SOURCE Lama glama (llama)
 ORGANISM Lama glama
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
 Camelidae; Lama.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 396)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.,
 Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Selection of VHH antibody fragments against crotoxin, a neurotoxin
 of Crotalus d. terrificus
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 396)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.,
 Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-AUG-2013) Laboratorio de Engenharia de Anticorpos,
 Fundacao Oswaldo Cruz Rondonia, Rua da Beira 7671, Porto Velho,
 Rondonia 76812-245, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..396
 /organism="Lama glama"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9844"
 /clone="16"
 /cell_type="peripheral blood lymphocyte"
 CDS <1..>396
 /note="IgGVH"
 /codon_start=1
 /product="immunoglobulin heavy chain variable region"
 /protein_id="AHA50074.1"
 /db_xref="GI:558064672"
 /translation="MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYAMGWRQAPG
 KEREFAQAITWSRGMTFYADSVKGRFTIARDYAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASD
 EGTGSPGSLYTPDPYDWGQGTQVTVTVSS"
 ORIGIN
 1 atggccgagg tccagctgca ggcgtctggg ggaggattgg tgcaggctgg gggctctctg
 61 agactctcct gtgcagcctc tggacgcacc ttcagtaact atgccatggg gtggttccgt
 121 caggctccag ggaaggagcg tgagtttcaa gcagctatta cgtggagtcg aggtatgaca
 181 ttttatgcag actccgtgaa gggccgattc accatcgcca gagactacgc caagaacacg
 241 gtgtatttgc aaatgaacag cctgaaacct gaggacacgg ccgtttatta ctgtgcagct
 301 tcagacgagg gaaccggtag tcttggttct ctttacacc cgcacctta tgactactgg
 361 ggccagggga cccaggtcac cgtcaccgtc tctca

LOCUS **KF498605** 387 bp mRNA linear MAM 20-NOV-2013
 DEFINITION Lama glama clone 42 immunoglobulin heavy chain variable region
 mRNA, partial cds.
 ACCESSION KF498605
 VERSION KF498605.1 GI:558064676
 KEYWORDS .
 SOURCE Lama glama (llama)
 ORGANISM Lama glama
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
 Camelidae; Lama.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 387)
 AUTHORS Barros,M.L., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.
 and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Selection of VHH antibody fragments against crotoxin, a neurotoxin
 from Crotalus d. terrificus
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 387)
 AUTHORS Barros,M.L., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.
 and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-AUG-2013) Laboratorio de Engenharia de Anticorpos,
 Fundacao Oswaldo Cruz Rondonia, Rua da Beira 7671, Porto Velho,
 Rondonia 76812-245, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..387
 /organism="Lama glama"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9844"
 /clone="42"
 /cell_type="peripheral blood lymphocyte"
CDS <1..>387
 /note="IgGVH"
 /codon_start=1
 /product="immunoglobulin heavy chain variable region"
 /protein_id="AHA50075.1"
 /db_xref="GI:558064677"
 /translation="MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRRQAPG
 KEREFAQAITWSRGMTFYADSVKGRFTIARDYAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASD
 EGTGSPGSLYTPDPYDWGQVTVTVSS"
 ORIGIN
 1 atggccgagg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggattgg tgcaggctgg gggctctctg
 61 agactctcct gtgcagcctc tggacgcacc ttcagtaact atgccatggg gtggttccgt
 121 caggctccag ggaaggagcg tgagtttcaa gcagctatta cgtggagtcg aggtatgaca
 181 ttttatgcag actccgtgaa gggccgattc accatcgcca gagactacgc caagaacacg
 241 gtgtatattgc aaatgaacag cctgaaacct gaggacacgg ccgttttatta ctgtgcagct
 301 tcagacgagg gaaccggtag tcttggttct ctttacaccc ccgaccctta tgactactgg
 361 ggccaggtca ccgtcaccgt ctctctca

LOCUS **KF498606** 345 bp mRNA linear MAM 20-NOV-2013
 DEFINITION Lama glama clone 12 immunoglobulin heavy chain variable region
 mRNA, partial cds.
 ACCESSION KF498606
 VERSION KF498606.1 GI:558064681
 KEYWORDS .
 SOURCE Lama glama (llama)
 ORGANISM Lama glama
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Tylopoda;
 Camelidae; Lama.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 345)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.,
 Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Selection of VHH antibody fragments against crotoxin, a neurotoxin
 from Crotalus d. terrificus
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 345)
 AUTHORS Luiz,M.B., Luz,M.G.B.S., Pereira,S.S., Kayano,A.M., Stabeli,R.G.,
 Soares,A.M. and Fernandes,C.F.C.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (02-AUG-2013) Laboratorio de Engenharia de Anticorpos,
 Fundacao Oswaldo Cruz Rondonia, Rua da Beira 7671, Porto Velho,
 Rondonia 76812-245, Brazil
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..345
 /organism="Lama glama"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9844"
 /clone="12"
 /cell_type="peripheral blood lymphocyte"
 CDS <1..>345
 /note="IgGVH"
 /codon_start=1
 /product="immunoglobulin heavy chain variable region"
 /protein_id="AHA50076.1"
 /db_xref="GI:558064682"
 /translation="MAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSIGSIFSIINGMGWYRQAPG
 KSRERVATIFSGGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMSSSLKPEDTAVYYCFRGGV
 WGQGTQVTVTVSS"
 ORIGIN
 1 atggccgagg tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tgcagcctgg ggggtctctg
 61 agactctcct gcgtagtctc tggaagcatc ttcagtatca atggcatggg ctggtaccgc
 121 caggctccag gaaagtctcg cgagcgggtc gctactatth ttagtggtgg tagcacaac
 181 tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaacgcaa gaacacggtg
 241 tatctgcaaa tgagcagtct gaaacctgaa gacacggccg tctattactg ttttaggggc
 301 ggcgttttgg gccaggggac ccaggtcacc gtcaccgtct cctca